
MASTERARBEIT

Frau
Nadine Sella

**Wirksamkeit von Effluxpumpen-
Inhibitoren gegen grampositive
pathogene Bakterien**

Mittweida, 2017

MASTERARBEIT

**Wirksamkeit von Effluxpumpen-
Inhibitoren gegen grampositive pathogene
Bakterien**

Autor:

Frau

Nadine Sella

Studiengang:

Molekularbiologie/ Bioinformatik

Seminargruppe:

MO14w1-M

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. P. Radehaus

Zweitprüfer:

Dr. rer. nat. O. Makarewicz

Einreichung:

Mittweida, 12.01.2017

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2017

Bibliographische Beschreibung:

Sella, Nadine: Wirksamkeit von Effluxpumpen-Inhibitoren gegen grampositive pathogene Bakterien. - 2017. - Seitenzahl Verzeichnisse: 14, Seitenzahl des Inhaltes: 96, Seitenzahl der Anhänge 7 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Masterarbeit, 2017

Englischer Titel

Effectiveness of efflux pump inhibitors against gram positive pathogenic bacteria

Kurzbeschreibung:

Diese Arbeit befasst sich mit der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Titerplattenformat für Antibiotika und/oder Effluxpumpen-Inhibitoren anhand verschiedener klinischer Isolate von *E. faecalis*, *E. faecum* und *S. aureus* und dem Vergleich mit bereits vorhandener Literatur. Aufbauend auf den ermittelten MHK-Werten wurden dann Bestimmungen der minimalen Biofilm-inhibierenden Konzentration am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt. Die Klonalität der verwendeten Isolate wurde mittels Random Amplified Polymorphic DNA-PCR und den daraus erstellten Dendrogrammen geprüft.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Masterarbeit geholfen haben.

Besonders möchte ich mich bei meinen Betreuern Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus und Dr. rer. nat. Oliwia Makarewicz bedanken, die mir die Bearbeitung dieses Themas ermöglicht haben. Des Weiteren gebührt meinen Kollegen aus dem Labor des Zentrums für Infektionsmedizin und Krankenhaushygiene ein herzlicher Dank für die vielen Ratschläge.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während meiner Arbeit moralisch unterstützt haben, bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Staphylokokken	4
1.1.1 S. aureus.....	5
1.1.2 S. epidermidis	5
1.2 Enterokokken	6
1.2.1 E. faecalis.....	7
1.2.2 E. faecium	8
1.3 Aufbau und Lebenszyklus von Biofilmen	8
1.4 Funktionsweise von Efflux-Pumpen und ihre Hauptfamilien	10
1.5 RAPD-PCR im Vergleich zur PCR	14
2 Zielstellung	18
3 Material.....	19
3.1 Chemikalien	19
3.2 Medien	20
3.3 Mikroorganismen.....	21
3.4 Molekularbiologische Reagenzien.....	22
3.5 Material.....	23
3.6 Geräte.....	24
3.7 Software	24
4. Methoden	25
4.1 Anlegen von Kryokulturen	25
4.2 Vorbereitung der Bakterien aus den Kryokulturen für mikrobiologische Untersuchungen	25
4.3 Herstellung der Antibiotika-Stammlösung bzw. der EPI-Stammlösung	25
4.4 MHK-Bestimmung	26
4.5 GO PubMed und MeSH-Terme	28
4.6 Biofilm-Anzucht	29

4.7	Mikroskopie	30
4.8	DNA-Isolation	30
4.9	Etablierung der RAPD-PCR	31
4.10	Unterscheidung der Isolate mittels RAPD-PCR	33
4.11	Gelelektrophorese	33
4.12	Auswertung der RAPD-Gele anhand von Dendrogrammen.....	33
5	Ergebnisse.....	39
5.1	Auswertung der MHK-Bestimmung.....	39
5.1.1	MHK-Bestimmung mit Antibiotika.....	39
5.1.2	MHK-Bestimmung mit EPI's	40
5.2	GO PubMed	43
5.3	Biofilm-Anzucht und Bestimmung der MBIK	50
5.4	Auswertung der RAPD-PCR	62
5.4.1	Etablierung der RADP-PCR	62
5.4.2	Vergleich der Isolate für die einzelnen Spezies	66
6	Diskussion	80
7	Ausblick	87
8	Zusammenfassung	89
9	Summary.....	93
	Literaturverzeichnis	97
	Anhang.....	102
	Selbstständigkeitserklärung.....	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Entdeckung der Antibiotika und das Auftreten von Resistenzen [Hacker & Kumm, 2015]	1
Abbildung 2: <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> auf Blutagar [Gattermann, 2011]	4
Abbildung 3: <i>E. faecalis</i> auf Blutagar [www.bacteriainphotos.com, 2016]	7
Abbildung 4: Lebenszyklus von Biofilmen [Institut für Mikroökologie, 2016]	9
Abbildung 5: Funktionsweise von Effluxpumpen [Andersen et al., 2015]	10
Abbildung 6: Die Hauptfamilien der Effluxpumpen bei Bakterien [Piddock, 2006]	11
Abbildung 7: Auswirkung von Inhibitoren auf Effluxpumpen in Anwesenheit von Antibiotika [Sello, 2011]	13
Abbildung 8: Funktionsweise der RAPD-PCR anhand eines DNA-Templates [Kumar & Gurusubramanian, 2011]	14
Abbildung 9: Vergleich der RAPD-PCR bei einer Mutation im DNA-Template [Kumar & Gurusubramanian, 2011]	15
Abbildung 10: Unterscheidung von Individuen mittels RAPD-PCR und anschließender Gelelektrophorese [Gnis pädagogie, 2016]	16
Abbildung 11: Festlegung der Lanes am Beispiel von <i>E. faecium</i> mit den Primern AP4 und ERIC1R	34
Abbildung 12: Beispiel für unvollständige Detektion der Lanes bei <i>E. faecium</i> mit dem Primer M13R2	35
Abbildung 13: Markierung einzelner Banden mit PyElph am Beispiel von <i>E. faecium</i> mit den Primern AP4 und ERIC1R	36
Abbildung 14: Matching der RAPD-Banden am Beispiel von <i>E. faecium</i> mit den Primern AP4 und ERIC1R	37
Abbildung 15: Verteilung der MHK-Werte bei <i>E. faecalis</i>	40
Abbildung 16: Verteilung der MHK-Werte bei <i>E. faecium</i>	41
Abbildung 17: Verteilung der MHK-Werte bei <i>S. aureus</i>	42
Abbildung 18: Übersicht der Recherche für Probenecid	43
Abbildung 19: Übersicht der Recherche für Reserpin	44
Abbildung 20: Übersicht der Recherche für Sertralin	45
Abbildung 21: Übersicht der Recherche für Thioridazin	46

Abbildung 22: Verteilung der MHK-Werten für <i>E. faecalis</i> anhand von experimentellen Daten und Literaturwerten	47
Abbildung 23: Verteilung der MHK-Werten für <i>E. faecium</i> anhand von experimentellen Daten und Literaturwerten	48
Abbildung 24: Verteilung der MHK-Werten für <i>S. aureus</i> anhand von experimentellen Daten und Literaturwerten	49
Abbildung 25: Biofilm-Anzucht nach 24 Stunden	50
Abbildung 26: <i>E. faecalis</i> BK 1653, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung: 100x	51
Abbildung 27: <i>E. faecalis</i> BK 1653, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Reserpin (rechts), Vergrößerung: 100x	51
Abbildung 28: <i>E. faecalis</i> BK 1653, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertralin (rechts), Vergrößerung: 100x	52
Abbildung 29: <i>E. faecalis</i> BK 1653, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung: 100x	52
Abbildung 30: <i>E. faecalis</i> BK 6886/2, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung 100x	53
Abbildung 31: <i>E. faecalis</i> BK 6886/2, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Reserpin (rechts), Vergrößerung 100x	53
Abbildung 32: <i>E. faecalis</i> BK 6886/2, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertralin (rechts), Vergrößerung 100x	54
Abbildung 33: <i>E. faecalis</i> BK 6886/2, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung 100x	54
Abbildung 34: <i>E. faecium</i> Va 12812, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung 100x	55
Abbildung 35: <i>E. faecium</i> Va 12812, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertalin (rechts), Vergrößerung 100x	55
Abbildung 36: <i>E. faecium</i> Va 12812, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung 100x	56
Abbildung 37: <i>E. faecium</i> Va 14763, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertralin (rechts), Vergrößerung 100x	56

Abbildung 38: <i>E. faecium</i> Va 14763, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung 100x	57
Abbildung 39: <i>S. aureus</i> Va 17999, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung 100x	58
Abbildung 40: <i>S. aureus</i> Va 17999, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Reserpin (rechts), Vergrößerung 100x	58
Abbildung 41: <i>S. aureus</i> Va 17999, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertralin (rechts), Vergrößerung 100x	59
Abbildung 42: <i>S. aureus</i> Va 17999, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung 100x	59
Abbildung 43: <i>S. aureus</i> Va 32261, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung 100x	60
Abbildung 44: <i>S. aureus</i> Va 32261, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Reserpin (rechts), Vergrößerung 100x	60
Abbildung 45: <i>S. aureus</i> Va 32261, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertralin (rechts), Vergrößerung 100x	61
Abbildung 46: <i>S. aureus</i> Va 32261, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung 100x	61
Abbildung 47: Etablierung der RAPD-PCR für <i>E. faecalis</i> BK 1565 und BK 1653	62
Abbildung 48: Etablierung der RAPD-PCR mit <i>E. faecium</i> UR 6479 und UR 6112	63
Abbildung 49: Etablierung der RAPD-PCR für <i>E. faecium</i> UR 6112 und Va 14854....	64
Abbildung 50: Etablierung der RAPD-PCR für <i>S. aureus</i> Va 17834 und Va 32261	65
Abbildung 51: RAPD-PCR von 23 <i>E. faecalis</i> -Isolaten mit dem Primer ERIC1R	66
Abbildung 52: RAPD-PCR für 23 Isolate von <i>E. faecalis</i> mit dem Primer CC1	67
Abbildung 53: Dendrogramm zu <i>E. faecalis</i> mit dem Primer ERIC1R, erstellt mittels UPGMA	68
Abbildung 54: Dendrogramm zu <i>E. faecalis</i> mit dem Primer ERIC1R, erstellt mittels NJ	69
Abbildung 55: Dendrogramm zu <i>E. faecalis</i> mit dem Primer CC1, erstellt mittels UPGMA	70
Abbildung 56: Dendrogramm zu <i>E. faecalis</i> mit dem Primer CC1, erstellt mittels NJ..	71
Abbildung 57: RAPD-PCR für 20 <i>E. faecium</i> -Isolate mit dem Primer M13R2	73

Abbildung 58: RAPD-PCR für 20 <i>E. faecium</i> -Isolate mit den Primern AP4 und ERIC1R	74
Abbildung 59: Dendrogramm zu <i>E. faecium</i> mit dem Primer M13R2, erstellt mittels UPGMA	75
Abbildung 60: Dendrogramm zu <i>E. faecium</i> mit dem Primer M13R2, erstellt mittels NJ	76
Abbildung 61: Dendrogramm für <i>E. faecium</i> mit den Primern AP4 und ERIC1R, erstellt mittels UPGMA	77
Abbildung 62: Dendrogramm für <i>E. faecium</i> mit den Primern AP4 und ERIC1R, erstellt mittels NJ	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Statistik zu Sepsis-Erkrankungen [Deutsche Sepsis-Hilfe e.V., 2016]	3
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antibiotika	19
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten EPI's	19
Tabelle 4: Weitere Chemikalien	20
Tabelle 5: Verwendete Medien für die Anzucht der Bakterien	20
Tabelle 6: Primer der Firma Sigma-Aldrich	23
Tabelle 7: Schematische Darstellung der MHK-Bestimmung für EPI's (Doppelbestimmung)	28
Tabelle 8: Reaktionsansätze für die RAPD-PCR mit <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> und <i>S.</i> <i>aureus</i> mit je einem Primer	31
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die RAPD-PCR mit <i>E. faecalis</i> und <i>E. faecium</i> mit der Primerkombination AP4 und ERIC1R.....	31
Tabelle 10: RAPD-PCR zur Etablierung der Primer für <i>E. faecalis</i> und <i>E. faecium</i>	32
Tabelle 11: RAPD-PCR zur Etablierung der Primer bei <i>S. aureus</i>	32
Tabelle 12: MHK der Antibiotika für die Staphylokokken in mg/l.....	39
Tabelle 13: Reinheit der Antibiotika, Lösemittel und Ansatz der Stammlösung	102
Tabelle 14: Reinheit der EPI's, Lösemittel und Ansatz der Stammlösung	102
Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	103
Tabelle 16: MHK-Werte der EPI's für <i>E. faecalis</i> in mg/l	103
Tabelle 17: MHK-Werte der EPI's für <i>E. faecium</i> in mg/l	104
Tabelle 18: MHK-Werte der EPI's für <i>S. aureus</i> in mg/l.....	105
Tabelle 19: DNA-Konzentrationen von <i>E. faecalis</i> in ng/μl	106
Tabelle 20: DNA-Konzentration von <i>E. faecium</i> in ng/μl	107
Tabelle 21: DNA-Konzentrationen von <i>S. aureus</i> in ng/μl	108

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
AP-PCR	arbitrary primed PCR
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC-	American Type Culture Collection, Referenzstämme für
Stämme	Laboruntersuchungen
BK	Blutkultur
CFU	Colony Forming Units, bezeichnet die Anzahl der kolonienbildenden Einheiten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EPI	Effluxpumpen-Inhibitor
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FICI	fractional inhibitory concentration index
GO	Gene Ontology
Konz.	Konzentration
MATE	multidrug and toxic compound extrusion
MBEK	minimale Biofilm-eradizierende Konzentration
MBIK	minimale Biofilm-inhibierende Konzentration
MeSH	Medical Subject Headings
MFS	major facilitator superfamily
MHK	minimale Hemmkonzentration
MH-Medium	Mueller-Hinton-Medium
MIC	minimum inhibitory concentration
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
NJ	Neighbor Joining
OD	Optische Dichte

PCR	Polymerasekettenreaktion
RAPD-PCR	random amplified polymorphic DNA-PCR
RND	resistance nodulation division
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SMR	small multidrug resistance
SSRI	selektiver Serotonin-Rückaufnahme-Hemmer, engl. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor
ST	Stuhl
Stammlsg.	Stammlösung
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TH-Medium	Todd-Hewitt-Medium
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UR	Urin
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
Va	Varia
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VSE	Vancomycin-sensitive Enterokokken

1 Einleitung

Die Infektionskrankheiten sind ein bedeutendes Gesundheitsproblem [Aderem et al., 2011] und zählen mit 35% zur häufigsten Todesursache weltweit. Heutzutage gibt es zahlreiche Bakterienstämme, die Resistenzen gegenüber Antibiotika aufweisen (siehe Abbildung 1). Dazu zählen unter anderem Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), multiresistente Tuberkulose-Erreger sowie Penicillin-resistente Gonokokken und viele multiresistente gramnegative Stäbchenbakterien. Zudem kommen immer wieder neue Krankheitserreger hinzu oder bekannte Erreger werden durch den Massentourismus über den gesamten Globus transportiert. Oft wird die erfolgreiche Bekämpfung der einen Spezies vom Auftreten neuer Erreger begleitet, die nun verbesserte Ausbreitungsbedingungen haben. Die moderne medizinische Mikrobiologie beschäftigt sich mit Methoden zur Identifizierung von Krankheitserregern und trägt durch Empfindlichkeitstests gegenüber Chemopharmazeutika zur Therapie der Infektionen bei. [Suerbaum et al., 2012]

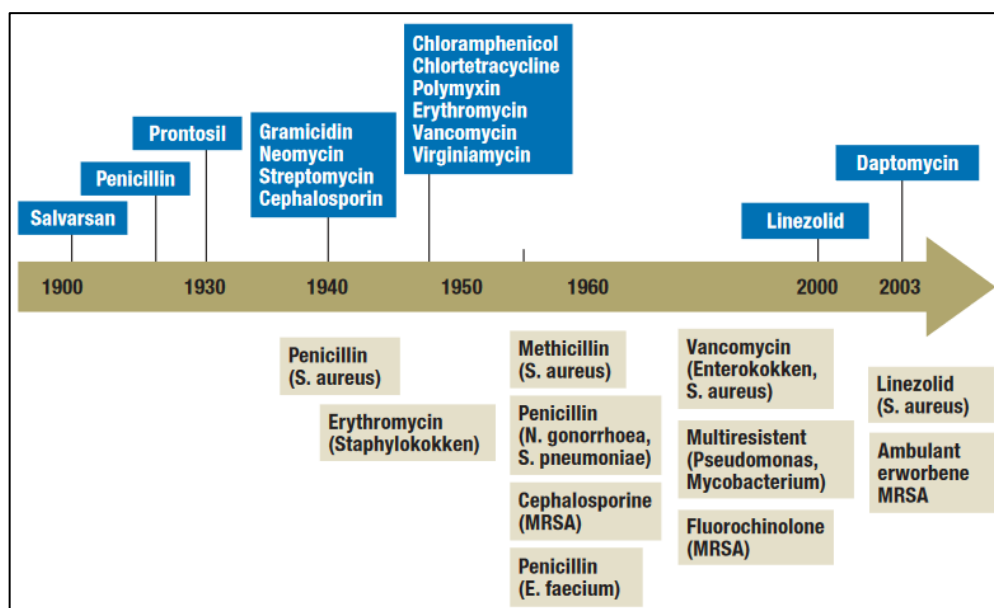


Abbildung 1: Die Entdeckung der Antibiotika und das Auftreten von Resistenzen [Hacker & Kumm, 2015]

Die Grafik zeigt einen Zeitstrahl für die Entdeckung neuer Antibiotika sowie für das Auftreten neuer Resistenzen. Dabei sind die Antibiotika blau hinterlegt, während die Resistenzen grau gekennzeichnet sind.

Wendet sich ein Patient mit einer akuten Infektion an einen Arzt, so erfolgt nicht in allen Fällen eine Diagnostik des Erregers. Da in diesem Fall der tatsächliche Erreger unbekannt ist, wird auf Verdacht ein Antibiotikum verordnet. Hier gibt es zwei mögliche Resultate: der Patient erholt sich von der Infektion oder die Therapie ist nicht erfolgreich. Im zweiten Fall wird dann ein Antibiotikum mit breitem Wirkspektrum eingesetzt, welches durch den erhöhten Selektionsdruck das Wachstum resistenter Erreger begünstigt. Des Weiteren bedeutet die Anwendung des Breitbandantibiotikums vermeidbare Kosten und eine geringere Effizienz als beim Einsatz eines Erreger-spezifischen Medikaments, bei dem die Empfindlichkeit des Erregers gegenüber bestimmten Antibiotika berücksichtigt wird. Der Nachweis des Erregers kann über serologische Methoden zum Nachweis von Antikörpern, immunologische Methoden zum Antigennachweis sowie molekularbiologische Methoden zum direkten Erregernachweis, z. B. Polymerasekettenreaktion, erfolgen. [Suerbaum et al., 2012]

Die Bestimmung der Erreger ist jedoch nur der erste Schritt einer erfolgreichen Therapie. Innerhalb einer Spezies können bei verschiedenen Stämmen unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antibiotika auftreten. Die Empfindlichkeit eines Erregers gegenüber einem antibiotisch wirkenden Mittel wird über die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Die MHK gibt die niedrigste Konzentration eines antibiotisch wirkenden Mittels, welches unter definierten *in vitro*-Bedingungen das Auftauchen sichtbaren Wachstums von einem Mikroorganismus in einem definierten Zeitraum verhindert, an. [Maciá et al., 2014]

Nicht richtig behandelte Infektionen können zu einer Sepsis führen. Diese kann schwerwiegende bis tödliche Folgen haben und wird zwischen drei Stadien unterschieden. Die einfache Sepsis ist dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheitserreger und ihre Gifte den Entzündungsherd verlassen und sich im Körper ausbreiten. Das Versagen einzelner Organe ist für eine schwere Sepsis typisch. Massiver Blutdruckabfall und gleichzeitiges multiples Organversagen kennzeichnen einen septischen Schock. [Deutsche Sepsis-Hilfe e.V., 2016]

Tabelle 1: Statistik zu Sepsis-Erkrankungen [Deutsche Sepsis-Hilfe e.V., 2016]

	Erkrankungen/Jahr	Todesfälle/Jahr	Sterberate
weltweit	1.500.000	500.000	33,3 %
USA	749.129	215.000	28,7 %
Europa	550.000	146.000	26,5 %
Deutschland	154.000	56.000	36,4 %

Durch die Ausbreitung resistenter Erreger ist die Suche nach neuen Antibiotika notwendig. Doch die Entwicklung neuer chemischer Komponenten, welche eine antimikrobielle Wirkung aufweisen, ist mit über 750 Millionen Dollar pro neuem Medikament teuer [Thanacoody, 2007]. Daher müssen neue Strategien zur Bekämpfung der Erreger angewendet werden [Aderem et al., 2011]. Dazu erfolgt zum Teil eine Rückbesinnung auf bereits zugelassene Medikamente, die zwar eine geringere antimikrobielle Wirkung aufweisen als die typischen Antibiotika, jedoch bei Resistenzen effektiver sein können [Thanacoody, 2007].

Ein Beispiel dafür ist Thioridazin, ein Medikament, welches jedoch aufgrund hoher Nebenwirkungen nicht mehr klinisch angewendet wird. So weist dieser Stoff bei MRSA eine MHK von 16 bis 50 mg/l auf und bei Enterokokken liegt die MHK zwischen 16 und 32 mg/l. Außerdem wurde eine antimikrobielle Aktivität gegen *M. tuberculosis*, *P. falciparum*, *T. cruzi*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* und *M. avium* nachgewiesen, jedoch wurden hier keine MHK-Werte bei diesen Bakterien aufgeführt. Des Weiteren wurden durch Gabe von Thioridazin entsprechend einer Konzentration von 25 bis 50 Prozent der ermittelten MHK folgende Verbesserungen bei der MHK erzielt: die MHK von Norfloxacin war um das zwei- bis achtfache geringer, während die MHK von Oxacillin mithilfe von Thioridazin auf 10 mg/l reduziert werden konnte, obwohl die MHK ohne Zugabe von Thioridazin höher als 500 mg/l war. Bei VRE kam es bei der Kombination von Thioridazin mit Vancomycin und Ampicillin zu synergetischen Effekten. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Thioridazin als Effluxpumpeninhibitor (EPI) wirkt. [Thanacoody, 2007] Deswegen stellt sich die Frage zur Wirksamkeit anderer EPI's. Außerdem wurde in der Vorarbeit [Sella, 2016] zu dieser Arbeit auch schon die Wirksamkeit von Sertralin in Kombination mit ausgewählten Antibiotika für *E. faecalis* getestet und bei Sertralin mit Clindamycin ein additiver Effekt ermittelt.

1.1 Staphylokokken

Bei Staphylokokken (siehe Abbildung 2) handelt es sich um grampositive kugelförmige Bakterien mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,5 Mikrometer. Derzeit sind 39 Staphylokokkenspezies bekannt. [Franke, 2006] Sie bilden keine Sporen und gehören zu den *Micrococceae*. Sie teilen sich in allen Ebenen des Raums und ordnen sich in dichten Haufen und Trauben an. Dies ist auf ihre Unbeweglichkeit zurückzuführen. [Hof & Dörries, 2014]

Staphylokokken weisen einen niedrigen Guanin-Cytosin-Gehalt auf. Ihr Wachstum erfolgt im Normalfall fakultativ aerob bei einem Temperaturoptimum von 30-37 °C. Jedoch liegt ihr Toleranzbereich zwischen zehn und 45 °C. Außerdem verfügen sie über eine Halotoleranz, d. h. sie vermehren sich auch noch bei einer Kochsalzkonzentration von zehn Prozent. Die Bakterien besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber UV-Strahlung, Austrocknung und Hitze sowie verschiedenen Desinfektionsmitteln. Durch die carotinoidhaltige Pigmentierung der Staphylokokken kann ihre Resistenz gegenüber UV-Strahlung erklärt werden. [Nagel, 2011]

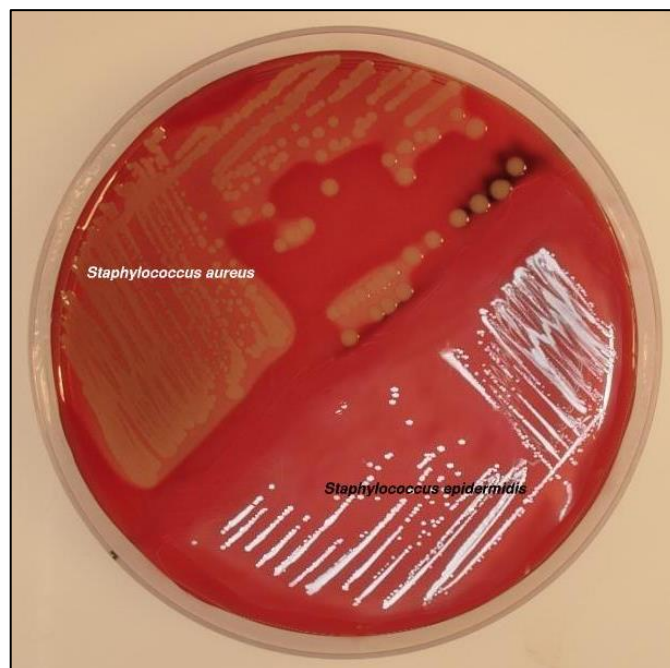


Abbildung 2: *S. aureus* und *S. epidermidis* auf Blutagar [Gatermann, 2011]

Auf dem Bild sind die beiden Hauptvertreter der Staphylokokken auf einer Blutagarplatte abgebildet.

1.1.1 *S. aureus*

S. aureus wurde erstmals 1881 vom Chirurgen Alexander Ogston beschrieben. Seiner gelben bis goldenen Pigmentierung verdankt es seinen Namen. Die Teilung der grampositiven Bakterien erfolgt in mehreren Ebenen, daher kommt es zur Bildung traubenförmiger Aggregate. [Nagel, 2011]

S. aureus besitzt die Fähigkeit zur Mannitolverwertung und produziert Koagulase. Auf seiner Zelloberfläche wurde die Anwesenheit von Protein A nachgewiesen. Dadurch lässt er sich von den anderen Staphylokokkenarten unterscheiden. [Müller, 2003] Außerdem bildet *S. aureus* als einzige Spezies das Enzym DNase. [Oethinger, 2000]

Das Bakterium gilt als Verursacher von Furunkeln, Abszessen, Mastitis, Toxischem Schock-Syndrom, Gastroenteritis und Endokarditis sowie Infekten des Respirationstraktes. [Oethinger, 2000]

Bei den für die Untersuchungen verwendeten Stämmen handelt es sich sowohl um Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) als auch um Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA).

Seitdem MRSA in den frühen 1960ern erstmal bemerkt wurde, sind MRSA-Stämme weltweit zum Hauptgrund nosokomialer Infektionen geworden [Polyzou et al., 2001; Kipp et al., 2004]. Dabei ist die Häufigkeit von MRSA-Isolationen mit der Zeit in einigen Ländern auf 30 % und mehr angestiegen [Polyzou et al., 2001]. Bei MRSA treten neben der Methicillinresistenz häufig zahlreiche Multiresistenzen auf. So wurden bei Untersuchungen von verschiedenen MRSA-Isolaten zum einen Resistenzen gegen β -Laktam-Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame nachgewiesen, zum anderen auch gegen Makrolide, Lincosamide und Gyrasehemmer, zu denen die Fluorchinolone gehören [Dömkes, 2008; Polyzou et al., 2001].

1.1.2 *S. epidermidis*

S. epidermidis ist ein Kugelbakterium, das auf Blutagarplatten als weiße Kolonien wächst, [Hof & Dörries, 2014] und kommt auf der gesamten Körperoberfläche vor [Franke, 2006]. Im Gegensatz zu *S. aureus* ist *S. epidermidis* Koagulase-negativ [Vuong & Otto, 2002]. Die Koagulase-negativen Staphylokokken-Stämme wurden früher als nicht pathogen angesehen, jedoch ist inzwischen bekannt, dass sie nosokomiale Infektionen bei immungeschwächten Patienten verursachen [Hubener & Goldmann,

1999; Ziebuhr et al., 2006]. *S. epidermidis* ist als Besiedler von künstlichen Oberflächen wie Kathetern oder künstlichen Gelenken bekannt und bildet dort vielschichtige Biofilme [Batzilla, 2006]. Allerdings weist *S. epidermidis* weniger Toxine und extrazelluläre Pathogenitätsfaktoren auf als *S. aureus* und daher ist der Verlauf der durch *S. epidermidis* ausgelösten Infektionen in der Regel subakut oder chronisch [Vuong & Otto, 2002]. Neben Katheter- und Implantatinfektionen ist der Erreger auch verantwortlich für Infektionen der Harnwege, Infektionen des Zentralen Nervensystems, Endokarditis und Infektionen des Auges infolge von Operationen oder dem Tragen von Kontaktlinsen [Batzilla, 2006].

Bei *S. epidermidis* konnte eine heterogene Genexpression festgestellt werden, die vermutlich zu einer besseren Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen führt. Das Bakterium verfügt nur über wenige lösliche und hoch aggressive Virulenzfaktoren, jedoch besitzt es Faktoren, um der Immunabwehr des Wirts entgehen zu können. Ein Beispiel dafür ist Protease SepA, welches antimikrobielle Peptide durch Proteolyse eliminiert. [Neumayer, 2014]

1.2 Enterokokken

Enterokokken sind grampositive Bakterien, die bis 1984 aufgrund des Lancefield-Antigen D, welches für Streptokokken typisch ist, zu den Streptokokken zugeordnet wurden. Erst später war eine Unterscheidung zwischen Enterokokken und Streptokokken möglich. Bis heute sind 38 verschiedene Spezies der Enterokokken bekannt [Vu & Carvalho, 2011]. Sie sind Katalase-negativ und wachsen fakultativ anaerob, dabei kommen sie einzeln, paarweise oder in kurzen Ketten vor. Sie können bei einem pH-Wert im Bereich von 4,5 bis 10 überleben [Eichler, 2013].

Bis zu einem pH-Wert von 9,6 im Medium mit 6,5%-iger Kochsalzlösung findet eine Vermehrung der Bakterien statt. Sie sind weitgehend unempfindlich gegen Gallensalze und gegen Temperatureinflüsse im Bereich von zehn bis 45 °C [Hof & Dörries, 2014].

Enterokokken verfügen über intrinsische Resistenzen gegen Penicillinase-stabile Penicilline, Cephalosporine und Clindamycin [Köhler et al., 2001].

Enterokokken sind ein Teil der Darmflora von Säugetieren. Dort beeinflussen sie die Verdauung positiv, weshalb sie von der Lebensmittelindustrie als probiotische Kulturen Anwendung finden [Becquet, 2003]. Sie beugen Durchfallerkrankungen vor oder werden zur Behandlung von Magen-Darm-Erkrankungen und chronischen Entzündungen der

Atemwege eingesetzt. Enterokokken sind an der Kohlenhydrat- und Eiweißverwertung beteiligt. Sie erhöhen den Widerstand gegenüber Pathogenen und haben einen positiven Einfluss auf das Immunsystem. Im Gegensatz dazu stehen jedoch die Enterokokken-Stämme, die humanpathogen wirken. Sie sind beispielsweise für Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen, Meningitis und Endokarditis sowie nosokomiale Infektionen verantwortlich. [Eichler, 2013]

1.2.1 *E. faecalis*

Die Spezies *E. faecalis* gilt als Haupterreger und ist für 70 bis 95 Prozent der durch Enterokokken verursachten Infektionen verantwortlich [Robert Koch Institut, 2010].

Das Bakterium, welches auf Blutagarplatten in Form von weißen Kolonien wächst, weist die Fähigkeit zur Bildung von Aggregationssubstrat auf. Dieses Adhäsion bindet an β 1-Integrine und hat wahrscheinlich eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese von durch Enterokokken verursachter Endokarditis. Die Aggregatsubstanz wird meistens auf Plasmiden kodiert, die auch Gene für Antibiotikaresistenzen tragen. Typische Resistenzen sind Betalaktam-, Aminoglykosid-, Makrolid und Glykopeptid-Resistenzen. [Köhler et al., 2001]

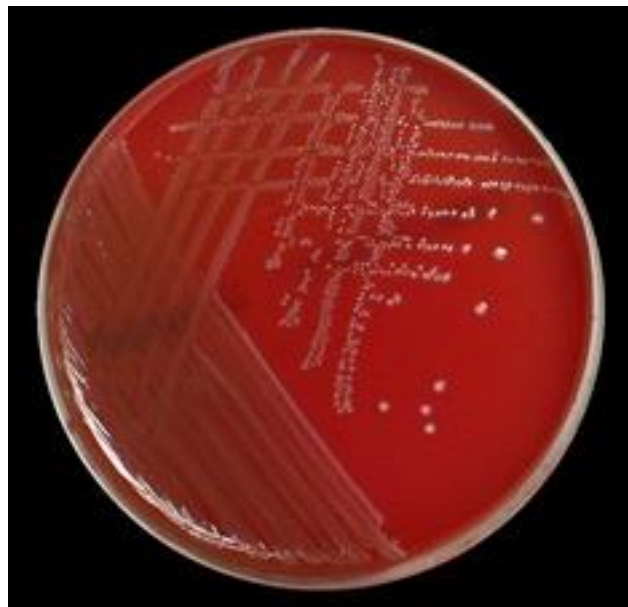


Abbildung 3: *E. faecalis* auf Blutagar [www.bacteriainphotos.com, 2016]

Die Abbildung zeigt eine Blutagarplatte, auf der ein Vereinzelungsausstrich mit *E. faecalis* durchgeführt wurde.

Endokarditis ist eine Krankheit, bei der eine Infektion der Herzklappen vorliegt. Wenn Enterokokken Endokarditis auslösen, so wird in 90 Prozent der Fälle *E. faecalis* als Auslöser ermittelt. Demnach ist diese Spezies der Hauptverursacher unter den Enterokokken. [Habib et al., 2015]

Enterokokken binden als Biofilme an diversen Oberflächen, z. B. an künstlichen Herzklappen, aber auch an natürlich beschädigtem Herzklappengewebe. Dadurch kommt es zu schweren und chronischen Verläufen bei der Endokarditis. Bei Biofilmen handelt es sich um organisierte Bakteriengemeinschaften, die in eine extrazelluläre Polymermatrix eingebettet sind. Biofilme können bis zu 1000-fach höhere Konzentrationen von Antibiotika tolerieren als planktonische Bakterienzellen und stellen die behandelnden Ärzte vor eine große Herausforderung. [Maciá et al., 2014]

1.2.2 *E. faecium*

Für die Unterscheidung von Enterokokken werden keine morphologischen Merkmale herangezogen. Jedoch unterscheidet sich *E. faecium* durch Wachstum in 0,1%-iger Methylenblaulösung, die Bildung von Ammoniak aus Arginin sowie die Säurebildung aus Sorbose, Arbutin und Melibiose von anderen Enterokokkenspezies. Manche Stämme von *E. faecium* bilden jedoch keine Säure aus Melibiose, sondern stattdessen aus Melizitose. Außerdem findet bei *E. faecium* keine Reduktion von Tetrazolium und keine Decarboxylierung von Tyrosin statt. [Weiß, 2003]

Für fünf bis 30 Prozent der durch Enterokokken ausgelösten Infektionen und Besiedlungen gilt *E. faecium* als Verursacher. In den letzten Jahren ist der Anteil der von *E. faecium* ausgelösten Infektionen im Vergleich zu *E. faecalis* gestiegen. Dabei macht der Erreger in einzelnen Kliniken bis zu 40 Prozent der durch Enterokokken ausgelösten Infektionen aus. [Robert Koch Institut, 2010]

1.3 Aufbau und Lebenszyklus von Biofilmen

Weniger als 0,1 Prozent der Bakterien liegen als planktonische Zellen vor [Sanyal, 2015]. Laut dem US National Institutes of Health sind Biofilme medizinisch bedeutsam, da sie für über 80% der mikrobiellen Infektionen verantwortlich sind [Davies, 2003].

Bei Biofilmen wird die minimale Biofilm-inhibierende Konzentration (MBIK) als die niedrigste Konzentration angegeben, die die Biofilmbildung hemmt. Die MBIK wird als das Äquivalent zur MHK verstanden. Die minimale Biofilm-eradizierende Konzentration

ist die niedrigste Konzentration, die benötigt wird um einen bestehende Biofilm zu eliminieren. [Maciá et al., 2014]

Die Entstehung eines Biofilms wird von planktonischen, also frei beweglichen Bakterienzellen, die sich reversibel an eine Oberfläche binden, eingeleitet. In dieser Phase sind die Bakterien noch anfällig gegen Antibiotika. Dies begründet auch den Erfolg von prophylaktischer Antibiotikaverabreichung bei Operationen. [Høiby et al., 2010] In den nächsten Stunden binden die Bakterien an die Oberfläche und vermehren sich. Dabei bilden sie Mikrokolonien an der Oberfläche und beginnen die Produktion einer Polymermatrix. Der Biofilm wächst zu pilz- oder turmartigen Gebilden heran, welche eine Stärke von bis zu 50 µm aufweisen. In diesem Stadium ist die maximale Resistenz gegen Antibiotika erreicht. Danach lösen sich Bereiche des Biofilms auf und die so freigesetzten Bakterien können sich verbreiten und an einer anderen Stelle anlagern, um dort neue Biofilme zu bilden. [Høiby et al., 2010]

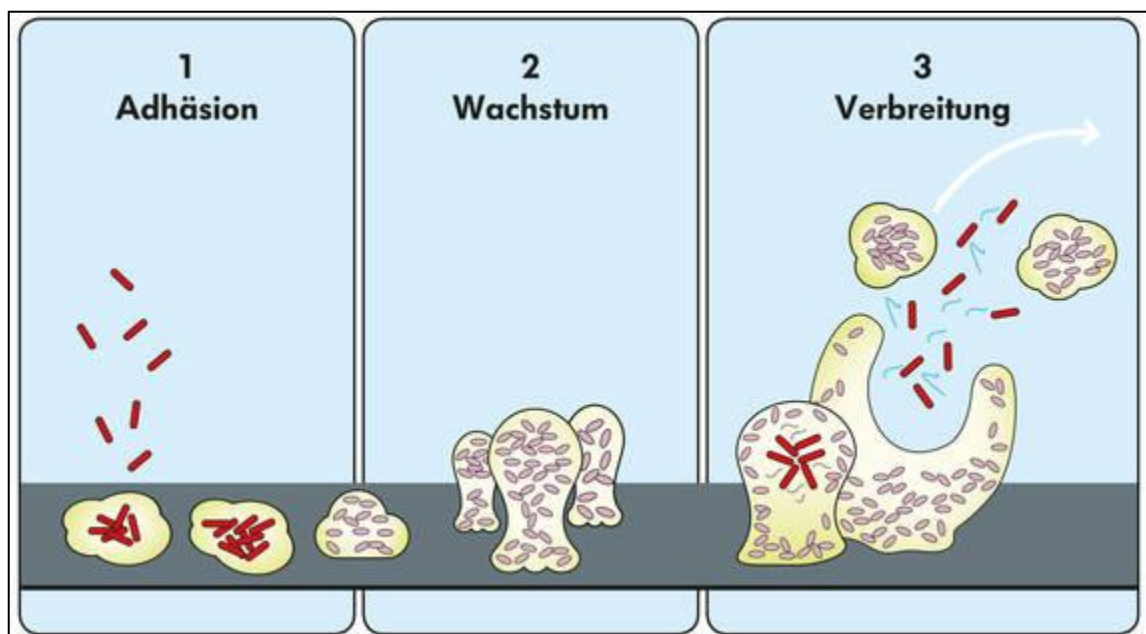


Abbildung 4: Lebenszyklus von Biofilmen [Institut für Mikroökologie, 2016]

Die Abbildung zeigt die drei Hauptphasen der Biofilmentwicklung. Diese beginnt mit der Adhäsion, bei der sich planktonische Zellen fest an eine Oberfläche anlagern. In der anschließenden Wachstumsphase bildet sich die Polymermatrix mit ihren Strukturen heraus. In der Phase der Verbreitung lösen sich Bakterien aus dem Biofilm heraus und verbreiten sich als planktonische Zellen, sodass der Prozess neu beginnen kann.

Ein ausgewachsener Biofilm kann wassergefüllte Kanäle aufweisen und damit einem primitiven mehrzelligen Organismus ähneln. Außerdem sind die Bakterien in Aggregaten zusammengelagert. Dabei handelt es sich um wichtige Eigenschaften, die Biofilme von planktonischen Zellen unterscheiden und die Diagnose und Therapie bedeutsam beeinflussen. [Høiby et al., 2010]

1.4 Funktionsweise von Efflux-Pumpen und ihre Hauptfamilien

Effluxpumpen sind Transportproteine, welche toxische Substrate aus dem Zellinneren an die Umgebung abgeben. Diese sind sowohl in gramnegativen als auch in grampositiven Bakterien aufzufinden und können sowohl spezifisch für ein Substrat sein als auch eine Anzahl von Substraten mit unterschiedlicher Struktur transportieren. [Webber & Piddock, 2003]

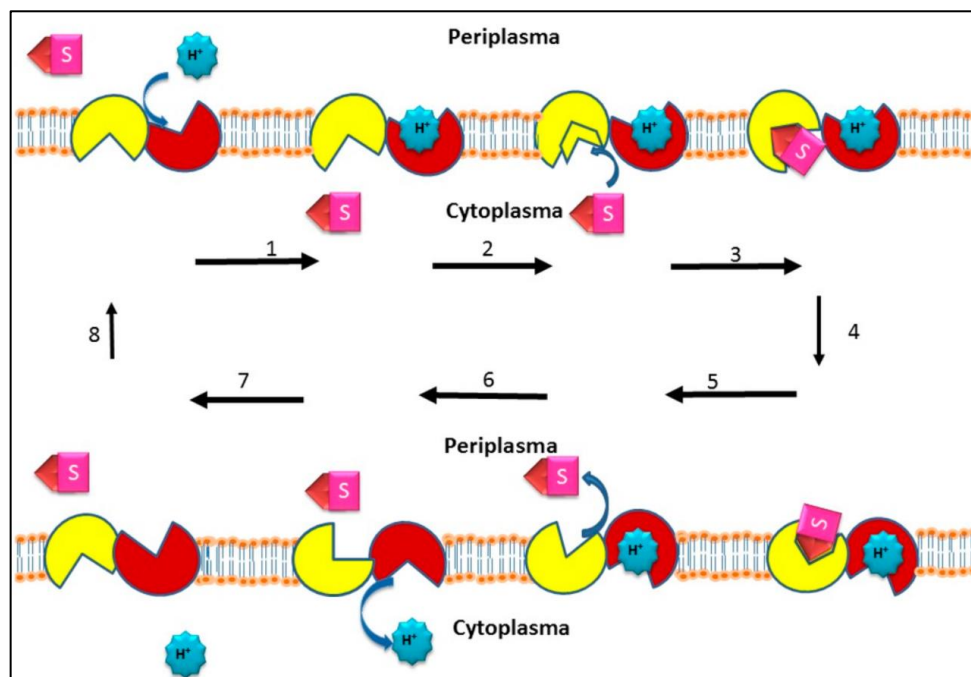


Abbildung 5: Funktionsweise von Effluxpumpen [Andersen et al., 2015]

Die Abbildung stellt die Funktionsweise von Effluxpumpen schematisch dar. Aus dem Periplasma lagert sich ein Wasserstoffion in der Effluxpumpe an (1). Im Cytoplasma steigt die Affinität für das Substrat S (2) und dieses lagert sich in der Pumpe an (3). Es kommt zu Konformationsänderungen in der Pumpe (4), dadurch findet die Translokation der geladenen Teilchen innerhalb der Pumpe statt (5). Das Substrat löst sich im Periplasma aus der Pumpe (6), was zum Austritt des Wasserstoffions aus der Pumpe führt (7). Der Vorgang endet damit, dass

die Pumpe ihren Ausgangszustand wiederherstellt (8), sodass es erneut zum Austausch kommen kann. [Andersen et al., 2015]

Bei den Effluxpumpen wird zwischen sechs Superfamilien unterschieden. Die *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE)-Familie, die *major facilitator superfamily* (MFS), die *small multidrug resistance* (SMR)-Familie, die *resistance nodulation division* (RND)-Familie und die *ATP binding cassette* (ABC)-Superfamilie (siehe Abbildung 6) sind in Mikroorganismen verbreitet [Marquez, 2005; Kourtesi et al., 2013; Piddock, 2006]. Die *multidrug endosomal transporters* (MET)-Familie ist jedoch nur bei höheren Eukaryoten anzutreffen [Kourtesi et al., 2013]. Bei den meisten Effluxpumpen dient die Protonenbewegungskraft als Energiequelle, jedoch bilden die ABC-Transporter hier eine Ausnahme [Webber & Piddock, 2003]. Insgesamt wurden über 250 verschiedene Familien in Organismen gefunden, die sich den Superfamilien zuordnen lassen. Von diesen Familien sind alle bis auf zehn Ausnahmen ausschließlich für den Stofftransport verantwortlich [Saier & Paulsen, 2001].

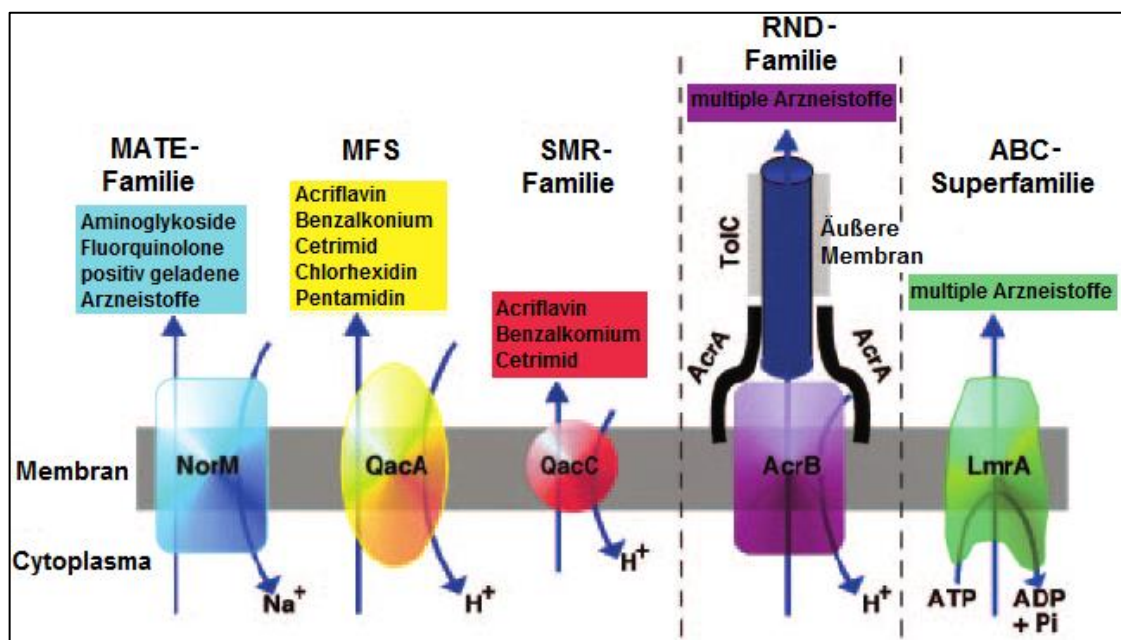


Abbildung 6: Die Hauptfamilien der Effluxpumpen bei Bakterien [Piddock, 2006]

Die Abbildung zeigt die fünf Hauptfamilien der Effluxpumpen mit den dazugehörigen Antibiotika, die diese Pumpen ausschleusen. Den Familien sind die Medikamente, welche sie aus der Zelle ausschleusen, zugeordnet. Bei MFS, der SMR Familie und der RND Familie erfolgt der

Austausch über ein Wasserstoffion, während die MATE Familie ein Natriumion für den Austausch benötigt. Bei der ABC-Superfamilie erfolgt der Austausch über ATP.

Die Effluxpumpen werden aufgrund ihrer Funktion zunehmend als ein bedeutender Ansatzpunkt bei der Antibiotika-Therapie angesehen (siehe Abbildung 7). Deswegen wurden bereits Inhibitoren entwickelt, die den Einfluss von Effluxpumpen auf Fluorquinolone reduzieren. Dabei fokussiert sich die Forschung vor allem auf *Pseudomonas aeruginosa*. Allerdings konnten auch beispielsweise für *S. aureus* ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Daher sollte der Effekt von Effluxpumpen beim Design zukünftiger Antibiotika beachtet werden. [Webber & Piddock, 2003]

In *S. aureus* wurden beispielsweise die MFS-Transporter TetK [Van Bambeke et al., 2000], QacA (Van Bambeke, 2000; Saier, 2001) und NorA [Van Bambeke et al., 2000; Saier & Paulsen, 2001] gefunden, während *S. epidermis* die Effluxpumpe MsrA [Van Bambeke et al., 2000; Saier & Paulsen, 2001] aufweist, welche der ABC-Superfamilie zuzuordnen ist. Außerdem weist die Spezies der Staphylokokken Effluxpumpen der DrugRA2-Familie auf, welche zur ABC-Superfamilie gehört. Auch die Enterokokken weisen Effluxpumpen der ABC-Superfamilie auf [Saier & Paulsen, 2001].

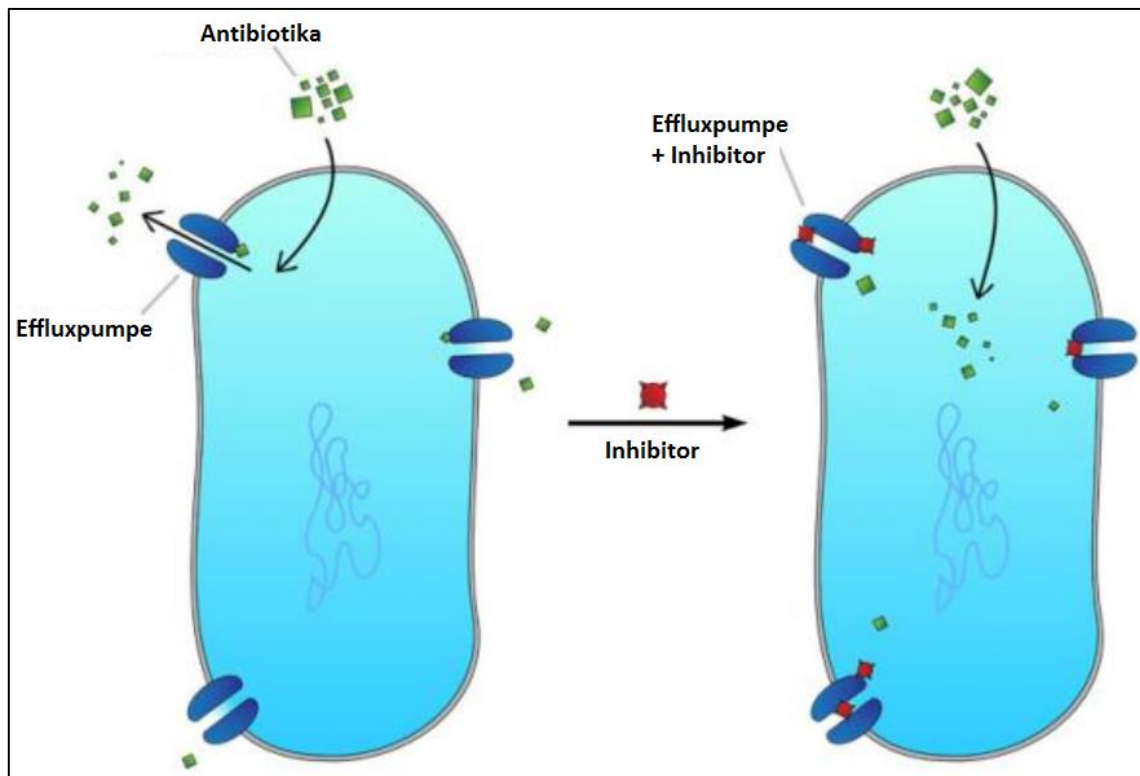


Abbildung 7: Auswirkung von Inhibitoren auf Effluxpumpen in Anwesenheit von Antibiotika [Sello, 2011]

Die Abbildung zeigt links die Funktionsweise einer Effluxpumpe in einer Bakterienzelle ohne Einfluss eines Inhibitors und rechts wie sich die Zugabe eines Inhibitors auswirkt. Dabei ist zu erkennen, dass links die Antibiotika durch die Effluxpumpe aus der Zelle ausgeschleust werden und rechts dieser Ausschleusvorgang nicht mehr möglich ist.

In dieser Arbeit wurden die EPI's Probenecid, Reserpin, Sertralin und Thioridazin verwendet. Probenecid ist ein Urikosurikum, welches bei Hyperurikämie und Gicht eingesetzt wird. Die durchschnittliche Dosierung beträgt ein bis drei Gramm pro Tag, wobei diese auf drei Einzeldosen aufgeteilt wird [Aktories et al., 2009]. Reserpin gehört zu den Indolalkaloiden und wird hauptsächlich zur Blutdrucksenkung sowie aufgrund seiner antipsychotischen Wirkung angewendet. Heutzutage beträgt die tägliche Dosis 0,25 mg pro Tag. Im Gegensatz dazu wurden früher bis zu 5 mg pro Tag verabreicht [Aktories et al., 2009]. Reserpin wirkt beispielsweise gegen die in *S. aureus* vorhandenen TetK-Transporter und die ABC-Transporter in einigen Bakterien [Marquez, 2005]. Der selektive Serotonin-Rückaufnahme-Hemmer Sertralin wird als Antidepressivum eingesetzt. Die Dosierung beträgt 50 mg pro Tag, kann jedoch wöchentlich um 50 mg auf

100 mg pro Tag gesteigert werden. Die Maximaldosis beträgt 200 mg am Tag [Karow & Lang-Roth, 2015]. Das Neuroleptikum Thioridazin gehört zu den Phenothiazinen und wird zur Behandlung von Psychosen eingesetzt. Die maximale Dosis schwankt zwischen 200 mg ambulant und 600 mg stationär. [Karow & Lang-Roth, 2015]. Thioridazin wurde 2005 aufgrund von als Nebenwirkung verursachten Herzrhythmusstörungen vom Markt genommen, da neue verbesserte Arzneimittel zur Behandlung von Psychosen eine Alternative darstellen [WHO, 2005]. Phenothiazine haben eine nachgewiesene Wirkung gegen die Effluxpumpen in *S. aureus* [Marquez, 2005].

1.5 RAPD-PCR im Vergleich zur PCR

Die random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) wurde 1990 unabhängig von zwei verschiedenen Laboren entwickelt und zunächst als RAPD-PCR und als arbitrary primed PCR bezeichnet. Bei dieser Form der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird ein einzelner, willkürlich gewählter Primer eingesetzt um diskrete DNA-Produkte zu amplifizieren. Dabei bindet der Primer an unterschiedlichen Stellen von gegenüberliegenden Strängen des DNA-Templates und es kommt zur Amplifikation der DNA, wenn die Primer in einem entsprechenden Abstand voneinander liegen. [Kumar & Gurusubramanian, 2011] Die Funktionsweise der RAPD-PCR ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

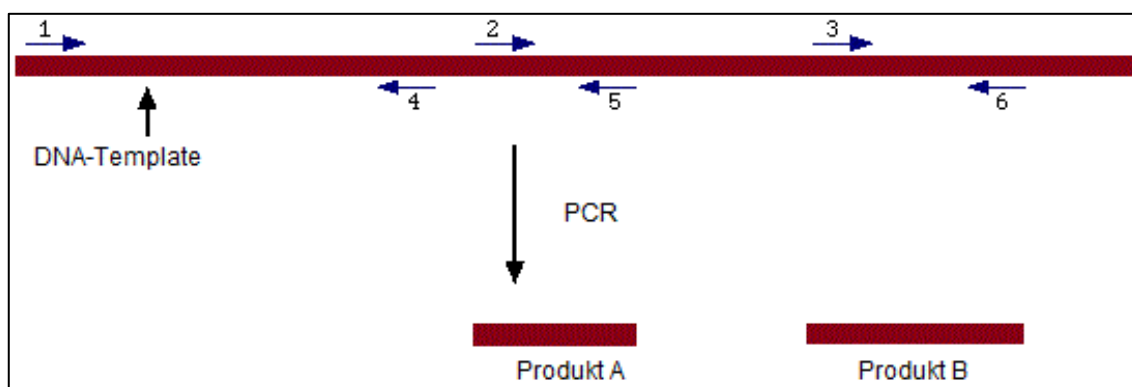


Abbildung 8: Funktionsweise der RAPD-PCR anhand eines DNA-Templates [Kumar & Gurusubramanian, 2011]

In der Abbildung ist die Funktionsweise der RAPD-PCR dargestellt. Zu sehen ist ein DNA-Template, an welches sich multiple Kopien eines Primers anlagern. Die Pfeile zeigen dabei die Richtung an, in welcher die DNA-Synthese stattfinden wird. Dabei lagern sich die Primer mit den Nummern 1, 2 und 3 an dem einen DNA-Strang an, die Primer mit den Nummer 4, 5 und 6 an

dem gegenüberliegenden. Bei dem hier dargestellten DNA-Template wird Produkt A mithilfe der Primer 2 und 5 sowie Produkt B mithilfe der Primer 3 und 6 amplifiziert. Die Primer 1 und 4 sind zu weit voneinander entfernt, daher wird hier kein Produkt amplifiziert.

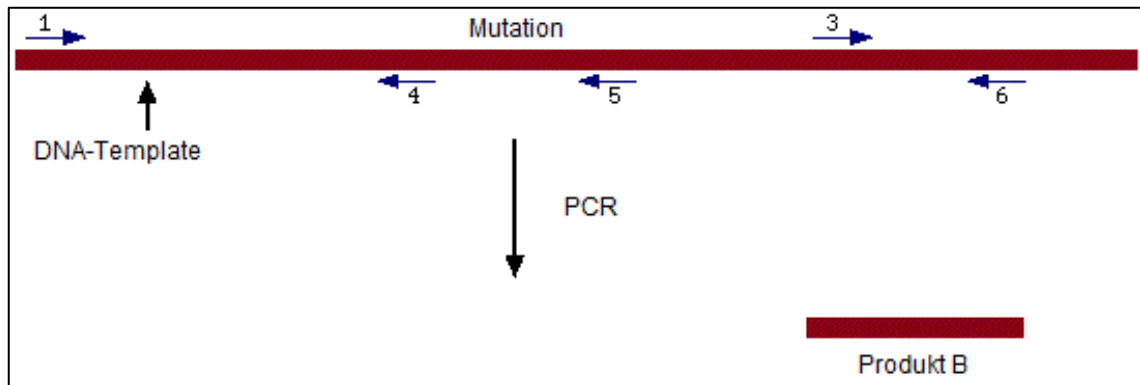


Abbildung 9: Vergleich der RAPD-PCR bei einer Mutation im DNA-Template [Kumar & Gurusubramanian, 2011]

Diese Abbildung zeigt eine Mutation in dem DNA-Template, die eine Anlagerung von Primer 2 verhindert. Daraus folgt, dass das Produkt A nicht amplifiziert werden kann.

Die Polymorphismen sind als Anwesenheit oder Abwesenheit einer RAPD-Bande zu sehen. In der Regel wird ein Agarose-Gel, welchem Ethidiumbromid zugesetzt wurde, zum Vergleich der PCR-Produkte verwendet. Damit können die Banden im Gel durch UV-Licht visualisiert werden. [Kumar & Gurusubramanian, 2011]

Der Vorteil der RAPD-PCR ist, dass kein Wissen über die DNA-Sequenz des Targets vorliegen muss, da die kurzen Primer an beliebigen Stellen im Genom binden können.

Außerdem werden nur geringe Mengen an DNA benötigt, damit sind schon 10 ng DNA pro Reaktion ausreichend. Weil keine Blotting- oder Hybridisationsschritte benötigt werden, handelt es sich um ein schnelles, effizientes und einfaches Verfahren, was sich auch in geringen Kosten im Vergleich zu anderen Markertechnologien äußert. Zudem kann eine große Anzahl an Fragmenten untersucht werden. [Kumar & Gurusubramanian, 2011]

Jedoch sind die RAPD-Marker dominant, daher lässt sich nicht unterscheiden, ob ein DNA-Segment von einem homozygoten oder heterozygoten Locus amplifiziert wurde. Des Weiteren haben Qualität und Konzentration der DNA sowie die PCR-Komponenten und die Bedingungen für den PCR-Lauf einen großen Einfluss und die RAPD ist extrem vom Labor abhängig und daher schwer zu reproduzieren. Ein weiterer Nachteil kann

daraus entstehen, dass das Amplifikationsprodukt vor der Reaktion nicht bekannt ist. Ein anderes Problem ist die Ko-Migration, d. h. es ist nicht klar, ob gleich große Banden auch denselben homologen DNA-Fragmenten entsprechen, da es sich bei Gelelektrophorese nur um ein quantitatives und kein qualitatives Trennverfahren handelt. [Kumar & Gurusubramanian, 2011]

Die Standard-PCR amplifiziert ein spezifisches DNA-Fragment, d. h. ein Teil der Sequenz muss bekannt sein. Die Amplifikation benötigt ein spezifisches Primerpaar, bestehend aus je einem Forward und Reverse Primer. [Kumar & Gurusubramanian, 2011]

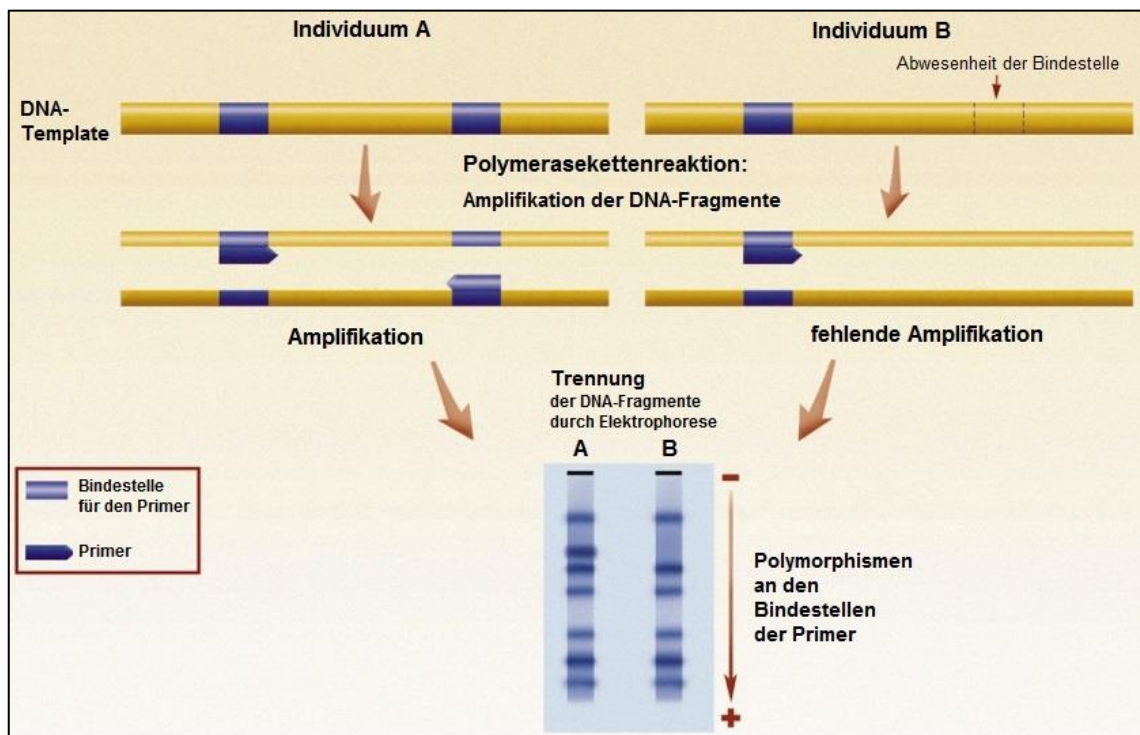


Abbildung 10: Unterscheidung von Individuen mittels RAPD-PCR und anschließender Gelelektrophorese [Gnis pädagogik, 2016]

In der Abbildung sind Ausschnitte der DNA-Templates der Individuen A und B zu sehen, die mittels RAPD-PCR vervielf tigt wurden. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Gelelektrophorese in verschiedene Banden aufgetrennt, was die Unterscheidung zwischen den beiden Individuen durch die Abwesenheit einer Bande bei B ermöglicht.

Zu den Anwendungsgebieten der RAPD-PCR zählen beispielsweise Studien zur genetischen Diversität und Polymorphismen, der Nachweis von Populations- und

Evolutionsgenetik, die Suche nach Pestizid- oder Herbizidresistenzen sowie die Kartierung von Genomen. [Kumar & Gurusubramanian, 2011]

In dieser Arbeit soll die RAPD-PCR eingesetzt werden, um die verwendeten Isolate auf Klonalität zu prüfen.

2 Zielstellung

In einem Teil der Masterarbeit soll die MHK für die EPI's Probenecid, Reserpin, Sertralin und Thioridazin anhand verschiedener Patientenisolates von *E. faecalis*, *E. faecium* und *S. aureus* sowie *S. epidermidis* bestimmt werden. Die Bestimmung soll zunächst an planktonischen Zellen durchgeführt und mit Literaturwerten verglichen werden. Anhand der ermittelten MHK-Werte sollen exemplarische Untersuchungen an Biofilmen mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie folgen. Der Zusammenhang zwischen den EPI's und den jeweiligen Stämmen sowie dem Einfluss auf antimikrobielle Mittel, auch in Bezug auf Biofilme, soll durch Recherchen mittels GOPubMed dargestellt werden. Des Weiteren soll mithilfe der RAPD-PCR ermittelt werden, ob es sich bei den verschiedenen Patientenisolaten um klonale Stämme handelt. Dazu soll mit mindestens zwei geeigneten Primern pro Spezies je ein RAPD-PCR-Lauf durchgeführt werden. Mithilfe der dadurch gewonnenen Gelbilder sollen phylogenetische Bäume erstellt und miteinander verglichen werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Molekulargewicht
Cefazolin Sodium Salt	TCI Europe N. V., Zwijndrecht, Belgien	476,48 g/mol
Ciprofloxacin Hydrochloride Ph. Eur.	AppliChem GmbH, Darmstadt	367,84 g/mol
Clinclamycin	TCI Europe N. V., Zwijndrecht, Belgien	424,98 g/mol
Flucloxacillin Sodium	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	475,85 g/mol
Rifampicin	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	822,94 g/mol
Vancomycin Hydrochloride	European Pharmacopoeia Reference Standard	keine Angabe vom Hersteller

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten EPI's

EPI	Hersteller	Molekulargewicht
Probenecid	TCI Europe N. V., Zwijndrecht, Belgien	285,36 g/mol
Reserpin	TCI Europe N. V., Zwijndrecht, Belgien	608,69 g/mol
Sertralin Hydrochloride	TCI Europe N. V., Zwijndrecht, Belgien	342,69 g/mol
Thioridazin Hydrochloride	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	407,04 g/mol

Tabelle 4: Weitere Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Calciumchlorid-Lösung 20 mg/l	hergestellt mit Calciumchlorid der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxide (DMSO) Hybri-Max®	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Essigsäure	MERCK-Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Ethidiumbromid, verdünnt auf 10 mg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Lösung 10 mg/l	hergestellt mit Magnesiumchlorid-Hexahydrat von MERCK, Darmstadt
Methanol	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Saline, 0,9%-ig	hergestellt mit Natriumchlorid der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIS-Hydrochlorid PUFFERAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100 (Alkylphenolpolyaethylenglycol)	Ferak Laborat GmbH, Berlin

3.2 Medien

Tabelle 5: Verwendete Medien für die Anzucht der Bakterien

Medium	Hersteller	Zusammensetzung
Mueller-Hinton-Bouillon für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	siehe Anhang
Todd-Hewitt-Bouillon für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	siehe Anhang
Blutagarplatten BD Columbia 5% Sheep Blood	BD, Heidelberg	siehe Anhang

3.3 Mikroorganismen

<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i>
ATCC 29212	Patientenisolat BK 6024 (VRE)	ATCC 29213 (MSSA)
Patientenisolat BK 245	Patientenisolat BK 6300 (VRE)	Patientenisolat BK 12963 (MRSA)
Patientenisolat BK 281	Patientenisolat BK 6382 (VRE)	Patientenisolat Va 17446 (MRSA)
Patientenisolat BK 848	Patientenisolat ST 2400	Patientenisolat Va 17834 (MRSA)
Patientenisolat BK 905	Patientenisolat ST 2499 (VRE)	Patientenisolat Va 17857 (MRSA)
Patientenisolat BK 1565	Patientenisolat ST 2621 (VRE)	Patientenisolat Va 17957 (MRSA)
Patientenisolat BK 1653	Patientenisolat ST 2681 (VRE)	Patientenisolat Va 17999 (MRSA)
Patientenisolat BK 2164	Patientenisolat UR 6122	Patientenisolat Va 18585 (MRSA)
Patientenisolat BK 3043	Patientenisolat UR 6396 (VRE)	Patientenisolat Va 18702 (MRSA)
Patientenisolat BK 3062	Patientenisolat UR 6452	Patientenisolat Va 19149 (MRSA)
Patientenisolat BK 4997/3	Patientenisolat UR 6479	Patientenisolat Va 31203 (MRSA)
Patientenisolat BK 5167	Patientenisolat UR 6560	Patientenisolat Va 31397 (MSSA)
Patientenisolat BK 5363/2	Patientenisolat UR 6755 (VRE)	Patientenisolat Va 31467 (MSSA)
Patientenisolat BK 5597/2	Patientenisolat Va 12610/5	Patientenisolat Va 31505 (MSSA)
Patientenisolat BK 6037/2	Patientenisolat Va 12757/3	Patientenisolat Va 31533 (MSSA)
Patientenisolat BK 6747/2	Patientenisolat Va 128212 (VRE)	Patientenisolat Va 31544 (MRSA)
Patientenisolat BK 6886/2	Patientenisolat Va 14079 (VRE)	Patientenisolat Va 31546 (MRSA)
Patientenisolat BK 7183	Patientenisolat Va 14727	Patientenisolat Va 31560 (MSSA)
Patientenisolat BK 8653	Patientenisolat Va 14763	Patientenisolat Va 31669 (MSSA)
Patientenisolat BK 8669	Patientenisolat Va 14854	Patientenisolat Va 31685 (MSSA)
Patientenisolat BK 9190		Patientenisolat Va 31727 (MSSA)
Patientenisolat BK 9367		Patientenisolat Va 32261 (MRSA)
Patientenisolat V067230		

Herkunft der Isolate: BK = Blutkultur, UR = Urin, ST = Stuhl, Va = Varia

- *S. epidermidis* Pp 62 a, mutierter Laborstrang

3.4 Molekularbiologische Reagenzien

- Lysozym (~20000 U/mg, 3x krist. Lyophilisiert, Molekulargewicht ~14000 g/mol), Carl Roth GmbH + Co. KG
- Enzymatischer Lysepuffer, hergestellt nach DNeasy Blood & Tissue Kit Seite 14, Qiagen
- Agarose NEEO Ultra-Qualität, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- 6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific
- Taq DNA Polymerase (recombinant, 5 U/μl), Thermo Scientific
- 10x Taq Buffer with KCl, Thermo Scientific
- MgCl₂ (2 mM), Thermo Scientific
- dNTP Set 1 (pH 7, 100 mM), Carl Roth GmbH + Co. KG
- 10x Dream Taq Green Buffer (includes 20 mM MgCl₂), Thermo Scientific
- Gene Ruler™ DNA Ladder Mix ready-to-use (0,1 μg/μl), Thermo Scientific
- λ DNA EcoRI + Hind III (0,5 μg/μl), Thermo Scientific
- GeneRuler™ 100 kb DNA Ladder, Thermo Scientific
- Dream Taq DNA Polymerase (5 U/μl), Thermo Scientific
- L7012 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, molecular probes® by life technologies™

Tabelle 6: Primer der Firma Sigma-Aldrich

Primer- Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
AP4	5'-TCACGATGCA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
M13R2	5'-GGAAACAGTATGACCATGA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
CC1	5'-AGCAGCGTGG	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
ERIC1R	5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTTCAG	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
P786	5'-GCGATCCCCA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
P797	5'-AGCGTCACTG	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
P798	5'-TGACCCGCC	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
S224	5'-CCCCTCACGA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
S232	5'-ACCCCCCACT	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
S395	5'-AAGAGAGGGG	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

3.5 Material

- DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen
- CELLSTAR® 96 Well Cell Culture Plate (steril, mit Deckel), greiner bio-one
- 8-well Zellkulturkammer auf Glas ablösbar, Sarstedt

3.6 Geräte

- Sterilwerkbank Type S-2010 1.2, Holten Lamin Air
- Spektrometer Multiscan GO, Thermo Scientific
- Thermoschüttler orbital Incubator S1500, Stuart
- Inkubator kelvitron® t, Heraeus Instruments
- Photospektrometer infinite M200 pro, TECAN
- Zentrifuge Microfuge® R CentriFuge, Beckman
- Thermomixer Mixing Block MB-100, BIOER
- Thermocycler Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510, Zeiss
- Gelektrophoresekammer BlueMarine 200, SERVA electrophoresis
- Stromversorgungsgerät Major Sciences MP-300V, SERVA electrophoresis
- G:Box Syngene, VWR
- Sony Cyber-shot, Exmor R 18.2 MEGAPIXELS Optical SteadyShot DSC-WX220

3.7 Software

- PyElph 1.4
- Tecan i-control 1.10.4.0
- Syngene GeneSnap

4. Methoden

In diesem Kapitel werden die Methoden, die für die Vorbereitung und Durchführung der MHK-Bestimmung sowie der Checkerboard Assays nötig sind, vorgestellt.

4.1 Anlegen von Kryokulturen

Zuerst wurden die zu untersuchenden Stämme auf Blutagarplatten ausgestrichen und als Übernachtskultur bei 37 °C inkubiert. Die Kryokulturen wurden für *S. aureus* ATCC 29213 und bk 12963 sowie für *S. epidermidis* Pp 62 a angelegt, da diese für mehrere Tests benötigt wurden. Am Folgetag wurde das Mueller-Hinton-Medium (MH-Medium) mit den Staphylokokken angeimpft. Die Suspensionen wurden bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert. Für die Kryokulturen wurden 100 µl Glycerin in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurden 900 µl der Suspension entnommen und in das Reaktionsgefäß hinzugegeben. Die Kulturen wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.2 Vorbereitung der Bakterien aus den Kryokulturen für mikrobiologische Untersuchungen

Die Bakterien wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen und bei 37 °C als Übernachtskultur inkubiert. Mithilfe der Übernachtskulturen wurde je eine Suspension durch Animpfen des jeweiligen Mediums hergestellt. Dabei wurde TH-Medium für die Enterokokken-Stämme und MH-Medium für die Staphylokokken-Stämme verwendet.

4.3 Herstellung der Antibiotika-Stammlösung bzw. der EPI-Stammlösung

Für die Herstellung der Antibiotika-Stammlösung bzw. einer EPI-Stammlösung, welche eine Konzentration von 10 mg/ml aufweisen soll, musste zunächst die Reinheit des Antibiotikums ermittelt werden, da den Feststoffen durch den jeweiligen Hersteller oft Salze zugesetzt wurden. Diese wurde bestimmt, indem das Molekulargewicht des Ausgangsstoffes zum Molekulargewicht des reinen Antibiotikums bzw. EPI ins Verhältnis gesetzt wurde.

$$\frac{\text{Molekulargewicht der Reinsubstanz} * 100 \%}{\text{Molekulargewicht der vorliegenden Susbtanz}} = \text{Reinheit in \%}$$

Mithilfe der Reinheit wurde wie folgt ermittelt, bei welcher Masse der vorliegenden Substanz eine Konzentration von 10 mg/ml vorliegt:

$$\frac{100 \% * 10 \text{ mg/ml}}{\text{Reinheit in \%}} = \text{Konzentration des Ansatzes der Stocklösung}$$

Entsprechend der Konzentration der vorliegenden Substanz wurde die benötigte Masse für einen Milliliter mithilfe der Feinwaage abgewogen und anschließend in einem Milliliter Lösemittel gelöst.

Die Antibiotika Cefazolin, Ciprofloxacin, Clindamycin und Vancomycin wurden in destilliertem Wasser gelöst, während Rifampicin in Methanol gelöst wurde. Die EPI's Probenecid und Sertralin wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) und Thioridazin in destilliertem Wasser gelöst. Reserpin wurde in 100%-iger Essigsäure gelöst, bei diesem EPI musste aufgrund der geringen Löslichkeit eine Stammlösung von 5 mg/ml hergestellt werden.

4.4 MHK-Bestimmung

Die Bestimmung der MHK für die Antibiotika erfolgte im Titerplattenformat nach den Vorschriften des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Zunächst wurde die MHK als Dreifachbestimmung angesetzt, später als Doppelbestimmung durchgeführt.

Für die Enterokokken wurde, abweichend von EUCAST, das TH-Medium verwendet. Für die Staphylokokken wurde Kationen-adjustiertes MH-Medium verwendet. Zu 50 ml MH-Medium wurden je 50 µl CaCl₂ (20 mg/ml) und MgCl₂ (10 mg/ml) hinzupipettiert. Für das Inokulum wurde zunächst eine OD-Messung der vorbereiteten Bakteriensuspensionen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde auf eine OD_{600nm} von 0,081 eingestellt. Diese Suspension wurde gevortext, dann 1:100 verdünnt und wieder gevortext. Das Volumen der hergestellten Lösung betrug 10 ml pro 96-Well-Platte, daher wurden zu 9,9 ml Medium 100 µl der Bakteriensuspension mit der OD_{600nm} von 0,081 pipettiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis gestellt.

Die Antibiotika-Stammlösung wurde mit der doppelten Höchstkonzentration für die MHK-Bestimmung hergestellt, da in der Kavität eine 1:2 Verdünnung durch die Zugabe

der Bakteriensuspension erfolgt. Die Berechnung des benötigten Volumens zur Herstellung der Stammlösung erfolgte mithilfe der folgenden Formel:

$$c1 * V1 = c2 * V2$$

Bei $c1$ handelt es sich um die Konzentration der Stammlösung, bei $V1$ um das Volumen der Stammlösung und bei $c2$ um die Zielkonzentration der Stammlösung. $V2$ ist das gesuchte Volumen. Die Konzentration der Stammlösung wurde im Normalfall auf 10 mg/ml eingestellt, bei Reserpin musste jedoch aufgrund der geringen Löslichkeit eine Konzentration von 5 mg/ml für die Stammlösung verwendet werden.

Beim Ansatz der Platte wurden je 200 µl Medium mit der doppelten Antibiotika-Höchstkonzentration in Kavität eins vorgelegt. In Kavität zwei bis zwölf wurden je 100 µl Nährmedium ohne Antibiotikum vorgelegt. Von Kavität eins bis elf wurden jeweils 100 µl überpipettiert und bei Linie elf 100 µl verworfen. Kavität zwölf wurde als Wachstumskontrolle angelegt.

Je 200 µl Medium mit der doppelten Antibiotika-Höchstkonzentration wurden in die erste Kavität vorgelegt. In die zweite bis zwölfte Kavität wurden je 100 µl Nährmedium ohne Antibiotikum vorgelegt. Von Kavität eins bis elf wurden jeweils 100 µl überpipettiert und bei Kavität elf 100 µl verworfen. Kavität zwölf wurde als Wachstumskontrolle angelegt. In alle Kavitäten wurden 100 µl Bakteriensuspension zugegeben. Die 96-Well-Platte wurde bei 37 °C für 16 bis 20 Stunden inkubiert.

Bei den Antibiotika wurden Endkonzentrationen von 64 mg/l bis 0,0625 mg/l getestet. Analog dazu wurde die MHK-Bestimmung für die EPI's als Doppelbestimmung durchgeführt, jedoch wurde die höchste Endkonzentration von Probenecid auf 512 mg/l erhöht. Außerdem wurde für die MHK-Bestimmung der EPI's mit Staphylokokken zusätzlich eine Vergleichsreihe mit MH-Medium ohne Kationen-Zusatz durchgeführt.

Tabelle 7: Schematische Darstellung der MHK-Bestimmung für EPI's (Doppelbestimmung)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konz. in mg/l	Stamm											
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	K.
Probenecid												
Probenecid												
Reserpin												
Reserpin												
Sertralin												
Sertralin												
Thioridazin												
Thioridazin												

4.5 GO PubMed und MeSH-Terme

Bei GO PubMed handelt es sich um eine Suchmaschine, die verschiedene Journals anhand von Gene Ontology (GO)- und Medical Subject Headings (MeSH)-Termen durchsucht. Aufgrund dieser Terme wird eine strukturierte und umfassende Suche ermöglicht, da diese eine einheitliche Sprache in den Biowissenschaften zum Ziel haben. GO-Terme werden in die drei Kategorien biologischer Prozess, molekulare Funktion und zelluläre Komponente unterteilt. Dabei beschreibt der biologische Prozess Stoffwechselwege und größere Prozesse, die sich aus den Aktivitäten mehrerer Genprodukte zusammensetzen. Die molekulare Funktion ist als molekulare Aktivität der Genprodukte definiert und die zelluläre Komponente ist der Ort, an dem die Genprodukte aktiv sind. [Gene Ontology Consortium, 2016]

Bei den MeSH-Termen handelt es sich um einen Thesaurus, der bei der Suche Synonyme und eventuell vorhandene andere Schreibweisen berücksichtigt. Dabei wird eine hierarchisch organisierte Terminologie verwendet, um biomedizinische Informationen für MEDLINE, PubMed und andere Datenbanken der National Library of Medicine zu indizieren und zu katalogisieren.

Zunächst wurde über GO PubMed eine Gesamtübersicht der vorhandenen Literatur zu den vier EPI's Probenecid, Reserpin, Sertralin und Thioridazin erstellt und diese mit Hilfe von MeSH- und GO-Termen in Bezug auf die verwendeten Bakterienspezies, Biofilme und in Verbindung mit Antibiotika verfeinert.

Bei der GOPubMed-Suche wurden folgende Terme verwendet:

- Probenecid[mesh]
- Reserpine[mesh]
- Sertraline[mesh]
- Thioridazine[mesh]
- Biofilms[mesh]
- "Anti-Infective Agents"[mesh]
- Staphylococcus[mesh]
- Enterococcus[mesh]
- Pseudomonas[mesh]
- Escherichia[mesh]
- Virulence[mesh]
- "biofilm formation"[go]
- "efflux transmembrane transporter activity"[go]

4.6 Biofilm-Anzucht

Für die Biofilm-Anzucht wurden je zwei Vertreter der verschiedenen Spezies ausgewählt. Die Auswahl erfolgte so, dass die unterschiedlichen MHK-Werte für die EPI's abgedeckt wurden. Bei *E. faecalis* wurden die Isolate BK 1653 und BK 6886/2, bei *E. faecium* die Isolate Va 12812 und Va 14763 und bei *S. aureus* die Isolate Va 17999 und Va 32261 als Biofilme angezogen. Dabei wurden unbehandelte Kontrollen mitgeführt und für die EPI's die Endkonzentration so gewählt, dass die Konzentration der maximalen Dosis der jeweiligen EPI's, die beim Menschen zulässig ist, entspricht. Die Konzentration wurde näherungsweise aus der maximalen täglichen Dosis bestimmt, in der Annahme, dass sich das Medikament auf durchschnittlich acht Liter Blut verteilt. Für die Kontrollen wurden die Enterokokken im TH-Medium und die Staphylokokken im MH-Medium inkubiert. Die Endkonzentrationen der Arzneimittel betrugen bei Probenecid 375 µg/ml, bei Reserpin 0,0625 µg/ml, bei Sertralin 25 µg/ml und bei Thioridazin 75 µg/ml. Insgesamt wurde 300 µl der Bakteriensuspensionen mit den gewählten EPI's für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert, nach 24 Stunden wurden 200 µl des Mediums abgenommen und durch 200 µl frisches Medium ersetzt.

4.7 Mikroskopie

Nach 48 h Anzucht der Bakterien wurde das Medium komplett abgenommen. Die Biofilme wurden mit 300 µl 0,9%iger Saline gewaschen und diese wurde anschließend abgenommen. Ein weiterer Waschschriff mit 200 µl der Saline erfolgte. Nach der Abnahme der Saline wurden 100 µl Färbelösung hinzugegeben. Die Färbelösung enthielt die beiden Farbstoffe SYTO 9 und Propidiumiodid und wurde in 0,9%-iger Saline entsprechend der Anweisungen im L7012 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit verdünnt. Nach Zugabe der Färbelösung wurden die Bakterien für 15 min im Dunkeln inkubiert. Dadurch sollten lebende Bakterien grün und tote Bakterien rot leuchten. Die Biofilme wurden unter einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop betrachtet. Dafür wurde eine zehnfache Vergrößerung beim Objektiv und eine zehnfache Vergrößerung beim Okular gewählt. Die Anregung erfolgte bei 488 nm, da das Anregungsmaximum von SYTO 9 bei 480 nm und das von Propidiumiodid bei 490 nm liegt [Thermofisher, 2004]. Die Emission lag zwischen 501 und 545 nm. Die Bildgröße betrug 1415,6 mal 1415,6 µm. Dies entspricht einer Pixelgröße von 1,38 µm. Die Öffnung der konfokalen Blende (Pinhole) betrug 1,06 Airy Units, dies entspricht 12 µm. Für die Bilder wurde ein Gain von 650-695 gewählt. Beim Gain handelt es sich um die Verstärkung, die beim Photonendetektionssystem angewendet wird, um die Lichtintensität zu erhöhen (Spitaler, 2008; Brown, 2007).

4.8 DNA-Isolation

Für die DNA-Isolation wurde zunächst TH-Medium bei Enterokokken und MH-Medium bei Staphylokokken mit je einer Bakterien-Kolonie angeimpft. Diese wurde von einer Blutagarplatte gepickt. Die Inkubation der Bakteriensuspensionen erfolgte als Übernachtskultur im Thermoschüttler bei 37 °C und 120 rpm. Die Isolation der DNA aus diesen Bakterien erfolgte nach dem „DNeasy Blood & Tissue Kit“ von Qiagen. Dabei fand das „Protocol: Pretreatment for Gram-Positive Bacteria“ Anwendung. Die Quantifikation der gewonnenen DNA-Menge und die Bestimmung von deren Reinheit erfolgte mithilfe des Photospektrometers infinite M200 pro von TECAN.

4.9 Etablierung der RAPD-PCR

Für die Etablierung der RAPD-PCR wurden für *E. faecalis* BK 1565 und BK 1653 die Primer AP4, CC1, M13R2 und ERIC1R sowie eine Kombination der Primer AP4 und ERIC1R getestet.

Für die Etablierung der RAPD-PCR wurden für *E. faecium* UR 6479 und UR 6112 die Primer AP4, CC1, M13R2 und ERIC1R sowie eine Kombination der Primer AP4 und ERIC1R getestet.

Für die Etablierung der RAPD-PCR wurden die *S. aureus*-Stämme Va17834 und Va32261 verwendet. Die Etablierung wurde mit den Primern P786, P797 und P798 sowie S224, S232 und S395 durchgeführt.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie in der folgenden Tabelle dargestellt für die jeweiligen einzelnen Primer zusammen:

Tabelle 8: Reaktionsansätze für die RAPD-PCR mit *E. faecalis*, *E. faecium* und *S. aureus* mit je einem Primer

Reagenz	Endkonzentration	1 Ansatz	3 Ansätze
DNA	50 ng		
10x Puffer	1x	5 µl	15 µl
10 mM dNTP's	0,2 mM	1 µl	3 µl
10 µM Primer	0,6 µM	3 µl	9 µl
5 U Taq-Polymerase	2 U	0,4 µl	1,2 µl
Nukleasefreies Wasser	-	ad. 50 µl	ad. 150 µl
Gesamtvolumen	-	50 µl	150 µl

Die nachfolgende Tabelle zeigt den Reaktionsansatz für die kombinierten Primer AP4 und ERIC1R.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die RAPD-PCR mit *E. faecalis* und *E. faecium* mit der Primerkombination AP4 und ERIC1R

Reagenz	Endkonzentration	1 Ansatz	3 Ansätze
DNA	50 ng		
10x Puffer	1x	5 µl	15 µl
10 mM dNTP's	0,2 mM	1 µl	3 µl
10 µM AP4	0,6 µM	3 µl	9 µl

10 µM ERIC1R	0,6 µM	3 µl	9 µl
5 U Taq-Polymerase	2 U	0,4 µl	1,2 µl
Nukleasefreies Wasser	-	ad. 50 µl	ad. 150 µl
Gesamtvolumen	-	50 µl	150 µl

Für beide Tabellen gilt, dass die benötigten Mengen an DNA entsprechend der mithilfe des Photospektrometers infinite M200 pro ermittelten Konzentrationen für die einzelnen Stämme berechnet und in den Mastermix eingesetzt wurden.

Tabelle 10: RAPD-PCR zur Etablierung der Primer für *E. faecalis* und *E. faecium*

	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C
45 Cyclen		
- Denaturierung	1 min	94 °C
- Annealing	1 min	CC1: 33 °C AP4: 34 °C AP4 + ERIC1R: 34 °C ERIC1R: 35 °C M13R2: 38 °C
- Elongation	2 min	72 °C
Finale Elongation	5 min	72 °C

Tabelle 11: RAPD-PCR zur Etablierung der Primer bei *S. aureus*

	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C
45 Cyclen		
- Denaturierung	1 min	94 °C
- Annealing	1 min	S224: 34 °C S232: 34 °C S395: 34 °C P786: 36 °C P797: 36 °C P798: 36 °C

- Elongation	2 min	72 °C
Finale Elongation	5 min	72 °C

4.10 Unterscheidung der Isolate mittels RAPD-PCR

Für die Unterscheidung der Isolate wurden Primer nach ihren Diskriminationsmöglichkeiten ausgewählt. Für *E. faecalis* wurden die Primer ERIC1R und CC1 für die Unterscheidung der Stämme ausgewählt. Bei *E. faecium* wurden die PCR-Läufe mit dem Primer M13R2 und der Primerkombination AP4 und ERIC1R durchgeführt. Die PCR-Läufe erfolgten analog zu den PCR-Läufen der Primeretablierung.

4.11 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,2-prozentiges Agarosegel verwendet. Dazu wurden für ein kleines Gel 0,6 g Agarose in 57 ml TAE durch Erhitzen gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren auf 60-65 °C abgekühlt, dann wurden 3 µl Ethyidiumbromid hinzugegeben und das Gemisch in die Gelkammer gegossen. Analog dazu wurde das große Gel mit 1,38 g Agarose, 115 ml 1x TAE und 6,2 µl Ethidiumbromid gegossen. Nachdem das Gel verfestigt war, wurde eine Gelelektrophorese bei 60 V durchgeführt.

4.12 Auswertung der RAPD-Gele anhand von Dendrogrammen

Die Auswertung der RAPD-Gele erfolgte mit dem Programm PyElph 1.4, einem Python-basiertem Programm, welches zur Analyse von Gelbildern verwendet wird. PyElph extrahiert Daten aus Gelbildern, berechnet Molekulargewichte der analysierten Fragmente, vergleicht DNA-Muster und erstellt phylogenetische Bäume. Damit ermöglicht die Software eine Auswertung von Gelbildern hinsichtlich Populationsgenetik, Phylogenie und Taxonomie sowie weiteren Anwendungen, die aus den Daten von Gelbildern gewonnen werden können. Sie findet bei den folgenden genetischen Markern Anwendung: Restriction Fragment Length Polymorphism, Amplified Fragment Length Polymorphism, Random Amplification of Polymorphic DNA und Short Tandem Repeat. [Pavel & Vasile, 2012]

PyElph ist in drei Hauptkomponenten gegliedert: die Toolbar, das Optionspanel und die Bildausgabe. In der Toolbar befinden sich Werkzeuge zum Bearbeiten des Gelbildes.

Mithilfe des Optionspanels werden die einzelnen Prozessschritte zur Auswertung durchgeführt und bei Bedarf Parameter angepasst. Die Bildausgabe zeigt die einzelnen Prozessschritte im Bild an und gibt am Ende das Dendrogramm aus. [Pavel & Vasile, 2012]

Bei den Gelbildern mussten zunächst die Lanes festgelegt und die zu vergleichenden Banden ermittelt werden. Im Anschluss wurden die Bandenmuster durch Matching verglichen und damit wurde eine Distanzmatrix erstellt, die dann als Dendrogramm grafisch dargestellt wurde. [Pavel & Vasile, 2012]

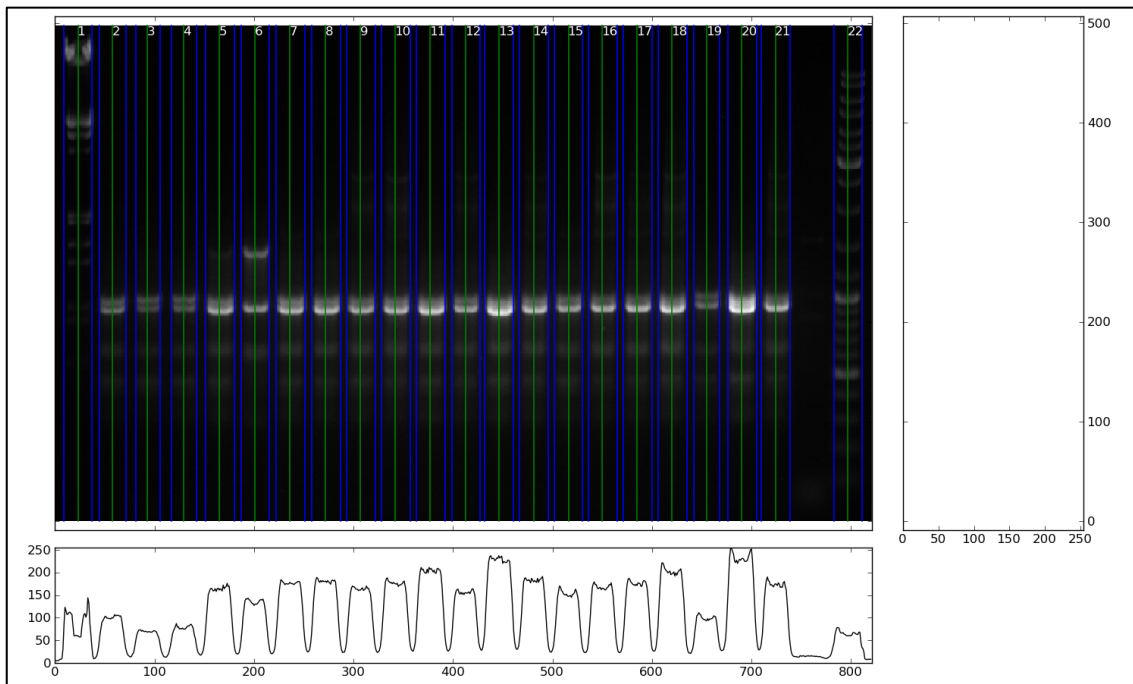


Abbildung 11: Festlegung der Lanes am Beispiel von *E. faecium* mit den Primern AP4 und ERIC1R

Dieses Bild zeigt die mittels PyElph 1.4 automatisch detektierten Lanes. Wurden Bandenmuster nicht erkannt, so konnten diese manuell hinzufügen werden. Bei der leeren Spalte zwischen Lane 21 und Lane 22 handelt es sich um die Negativkontrolle, daher ist die fehlende Detektion hier erwünscht.

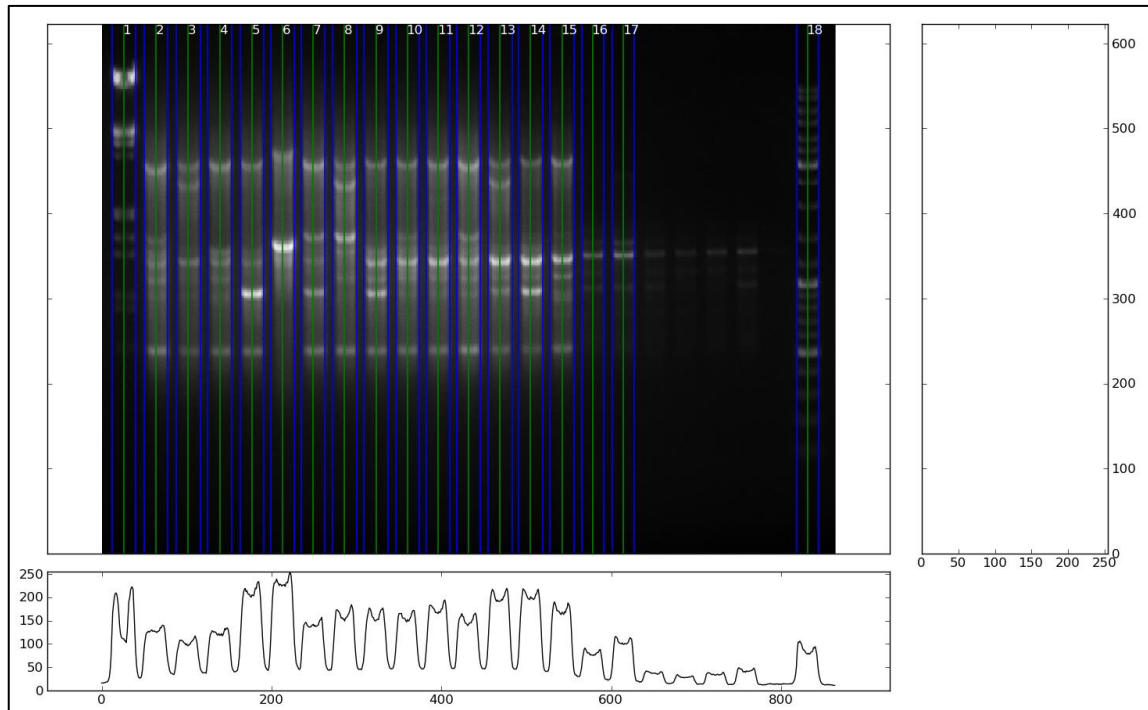


Abbildung 12: Beispiel für unvollständige Detektion der Lanes bei *E. faecium* mit dem Primer M13R2

Die automatische Detektion der Lanes durch PyElph 1.4 erfolgte hier nur unvollständig. Die vier nicht erkannten Lanes mussten manuell ergänzt werden, damit die Bandenmuster ausgewertet werden konnten.

Zum Auffinden der Lanes wurde der Maximalwert jeder Pixelspalte gemessen. Der Durchschnittswert der Breite der Lanes wurde aus einem Schwellwert berechnet, der automatisch auf 70% des Maximalwertes gesetzt wurde um Rauschen im Bild zu eliminieren. Anschließend wurde mit den so detektierten Lanes erneut gerechnet. Dabei wurden alle Lanes bestimmt, die eine Abweichung der Breite von höchstens 25% des Mittelwerts der Breite hatten. [Pavel & Vasile, 2012]

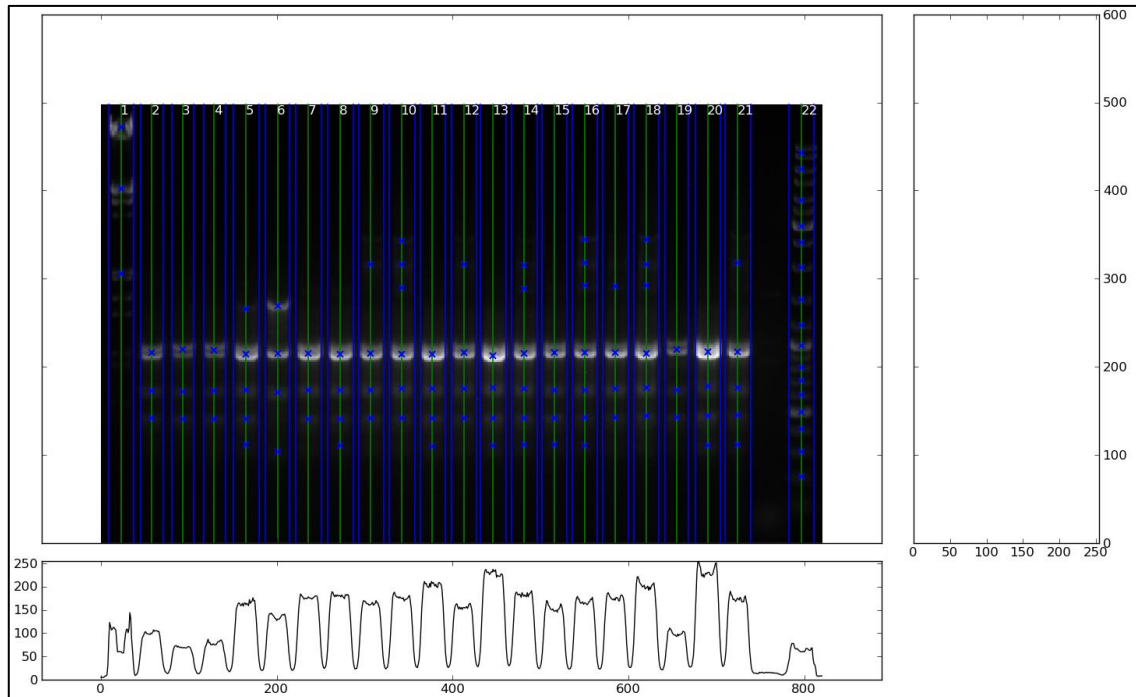


Abbildung 13: Markierung einzelner Banden mit PyElph am Beispiel von *E. faecium* mit den Primern AP4 und ERIC1R

Um einzelne Banden mit PyElph 1.4 markieren zu können, musste je nach Qualität des Gelbildes die Parameter Threshold sowie Filter width und Filter passes angepasst werden. Abbildung 13 wies einen Threshold von 10 auf, Filter width wurde auf 2 eingestellt und Filter passes auf 10.

Alle Banden, die realen molekularen Fragmenten entsprechen, wurden mit einem x markiert. Dies geschah automatisch, konnte aber auch durch eine Anpassung der Parameter oder manuelles Hinzufügen oder Entfernen von Banden angepasst werden. Bei der automatischen Bandenbestimmung wurden die Spalten einer Lane addiert. Diese Werte wurden mit einem Schwellwert (Threshold), welcher auf 20 gesetzt und mit der Breite der Lanes multipliziert wurde, verglichen. Der Filter width gibt an, wie viele Werte zur Berechnung des Mittelwertes für die aktuelle Position verwendet wurden. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$x_F[i] = \frac{1}{2 * width + 1} * \sum_{k=i-width}^{i+width} x[k]$$

Der Filter passes gibt an, wie viele Male der Filter auf das Bild angewendet wurde. [Pavel & Vasile, 2012]

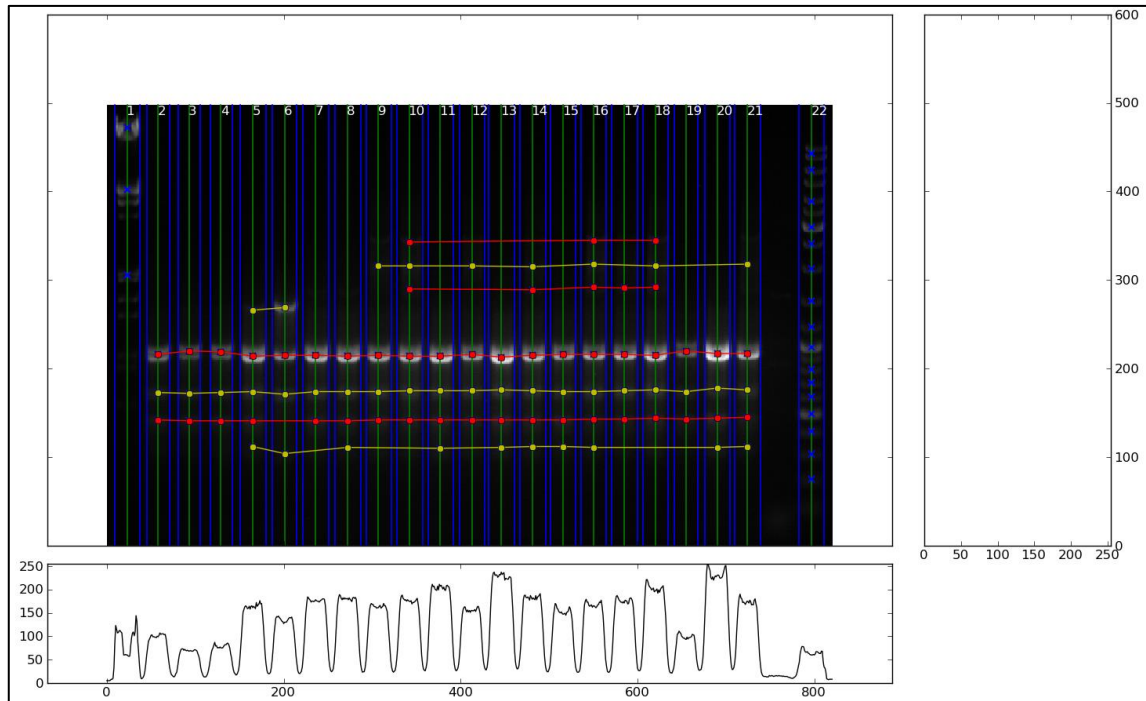


Abbildung 14: Matching der RAPD-Banden am Beispiel von *E. faecium* mit den Primern AP4 und ERIC1R

Abbildung 14 zeigt, wie übereinstimmende Banden mit derselben Farbe gekennzeichnet und miteinander verbunden wurden. Aus diesem Matching wurde eine Distanzmatrix erstellt.

Die RAPD-Banden wurden durch horizontale Linien oder isolierte Punkte gruppiert. Zur Unterscheidung der Cluster wurden die Linien bzw. Punkte abwechselnd rot oder gelb dargestellt. Ein heuristischer Algorithmus wurde für die Gruppierung verwendet. Um einer Gruppe angehören zu können, mussten Banden aus verschiedenen Lanes stammen und durften nur um weniger als 2% der Bildhöhe voneinander abweichen. [Pavel & Vasile, 2012]

Die An- oder Abwesenheit von Banden wurde durch 1 oder 0 gekennzeichnet. Daraus wurde die Distanzmatrix mithilfe des Dice-Koeffizienten berechnet.

$$Dice(S_i, S_j) = \frac{2 * \text{Anzahl der gemeinsamen Banden in den Lanes } i \text{ und } j}{\text{Anzahl der Banden in Lane } i + \text{Anzahl der Banden in Lane } j} \%$$

Aus dieser wurde unter Verwendung einer Clusteringmethode mithilfe des Dice-Koeffizienten ein Dendrogramm generiert. Dabei stehen im Programm die Methoden Neighbor Joining (NJ), Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

(UPGMA), Single Linkage, Complete Linkage und Weighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (WPGMA) zur Verfügung. [Pavel & Vasile, 2012]

Für die Auswertung der RAPD-Banden wurden die Clustering-Methoden UPGMA und NJ verwendet.

5 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der MHK-Bestimmung aufgeführt und statistische Analysen durchgeführt. Außerdem werden die darauf basierenden Mikroskopie-Aufnahmen ausgewertet. Des Weiteren werden die anhand von Gelbildern erstellten Dendrogramme zur RAPD-PCR analysiert und miteinander verglichen.

5.1 Auswertung der MHK-Bestimmung

Für die MHK-Bestimmung wurde überprüft, ob ein Bakterienstamm bei einer bestimmten Konzentration eines Antibiotikums oder eines EPI wächst. Als Wachstum zählen dabei sowohl eine Trübung der Kavität als auch das Wachstum einzelner Kolonien in der Kavität. Die MHK entspricht der niedrigsten Konzentration an einem antibiotisch wirkenden Mittel, bei der die Kavität kein Bakterienwachstum aufweist.

5.1.1 MHK-Bestimmung mit Antibiotika

Anhand der Analysen des Wachstums in den Kavitäten ergaben sich die folgenden MHK-Werte für die Antibiotika:

Tabelle 12: MHK der Antibiotika für die Staphylokokken in mg/l

Antibiotikum	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> bk 12963	<i>S. epidermidis</i> Pp 62 a
Cefazolin	0,5	> 64	8
Ciprofloxacin	0,25	> 64	≤ 0,0625
Clindamycin	≤ 0,0625	> 64	> 64
Flucloxacillin	0,25	> 64	> 64
Rifampicin	≤ 0,0625	> 64	≤ 0,0625
Vancomycin	1	1	1

Bei ATCC 29213 und bk12963 gibt es nur bei Vancomycin eine Übereinstimmung der MHK. Ansonsten ist ATCC 29213 sensitiv gegenüber allen verwendeten Antibiotika, 067230 weist hingegen eine Resistenz auf.

S. aureus ATCC 29213 und bk 12963 und *S. epidermidis* Pp 62 a gehören zur Gattung der Staphylokokken und weisen bei Vancomycin jeweils eine MHK von 1 mg/ml auf. Die MHK-Werte von Clindamycin und Flucloxacillin stimmen bei bk 12963 und Pp 62 a überein, während bei Rifampicin die MHK bei ATCC 29213 und Pp 62 a gleich ist. Bei Ciprofloxacin ist die MHK von Pp 62 a geringer als die von ATCC 29213 und damit auch

deutlich niedriger als die von bk 12963. Hingegen bei Cefazolin ist die MHK von Pp 62 a deutlich höher als die von ATCC 29213, jedoch deutlich geringer als die von bk 12963.

5.1.2 MHK-Bestimmung mit EPI's

Anhand der Analysen des Wachstums in den Kavitäten ergaben sich die folgenden MHK-Werte für die EPI's.

Bei allen Stämmen von *E. faecalis* wurde für Probenecid eine MHK größer als 512 mg/l bestimmt. Bei Reserpin betrug die MHK 8-16 mg/l, während die MHK bei Sertralin und Thioridazin 16-32 mg/l betrug. In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der MHK-Werte bei den *E. faecalis*-Isolaten zu erkennen.

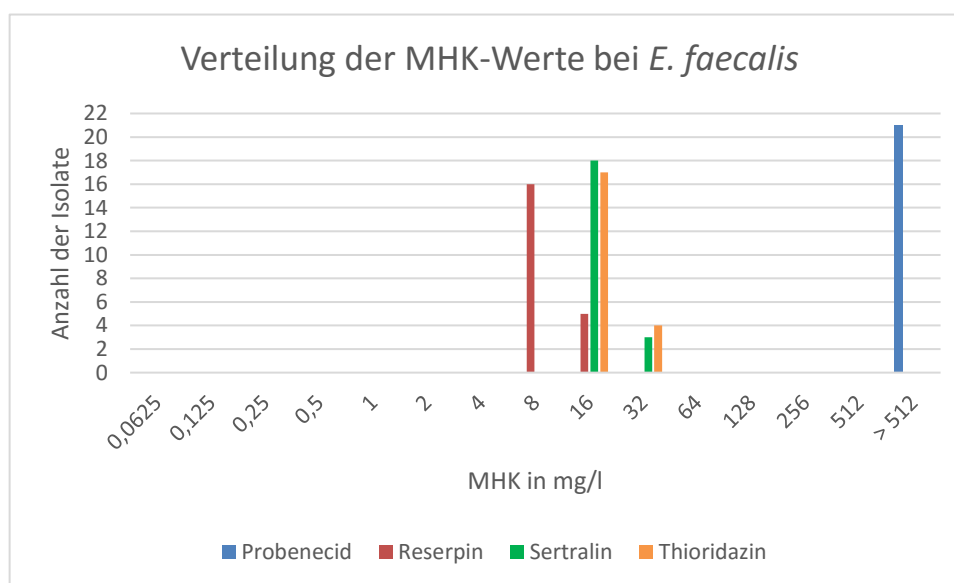


Abbildung 15: Verteilung der MHK-Werte bei *E. faecalis*

Das Diagramm zeigt die Verteilung der MHK-Werte der EPI's für *E. faecalis*. Diese ist für Reserpin zu vier Fünftel bei 8 mg/l und zu einem Fünftel bei 16 mg/l. Sertralin und Thioridazin weisen zwar dieselben MHK-Werte auf, diese sind jedoch hier anders verteilt. Probenecid weist mit größer als 512 mg/l für alle Isolate die größten MHK-Werte auf.

Bei allen Stämmen von *E. faecium* wurde für Probenecid eine MHK größer als 512 mg/l ermittelt. Bei Reserpin und Sertralin betrug die MHK jeweils 8-16 mg/l, während die MHK bei Thioridazin 16-32 mg/l betrug. Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der MHK-Werte von *E. faecium* bei den EPI's.

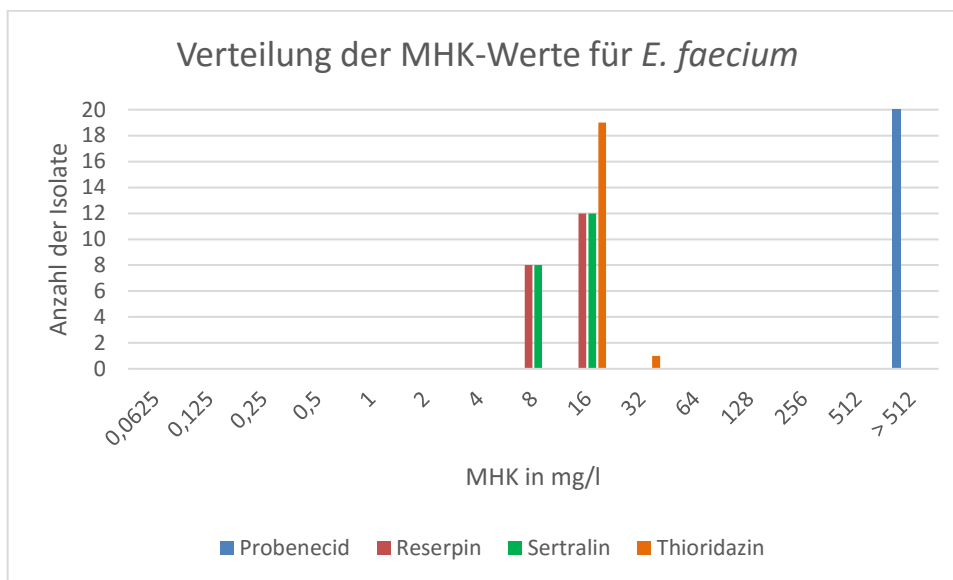


Abbildung 16: Verteilung der MHK-Werte bei *E. faecium*

Für Reserpin und Sertralin sind die MHK-Werte von 8 mg/l und 16 mg/l bei *E. faecium* mit einem Verhältnis von 8:12 gleich verteilt. Die MHK-Werte von Thioridazin betragen für fast alle Isolate 16 mg/l, aber ein Isolat wies eine MHK von 32 mg/l auf. Bei allen Isolaten hatte Probenecid mit größer als 512 mg/l die größte MHK.

Für *S. aureus* betrug die MHK bei Reserpin 8 mg/l, während die MHK bei Sertralin 16-32 mg/l betrug. Bei Thioridazin wurden MHK-Werte von 8-32 mg/ml ermittelt und bei Probenecid ergaben sich MHK-Werte, die größer als 512 waren. In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der MHK-Werte bei den *S. aureus*-Isolaten zu erkennen.

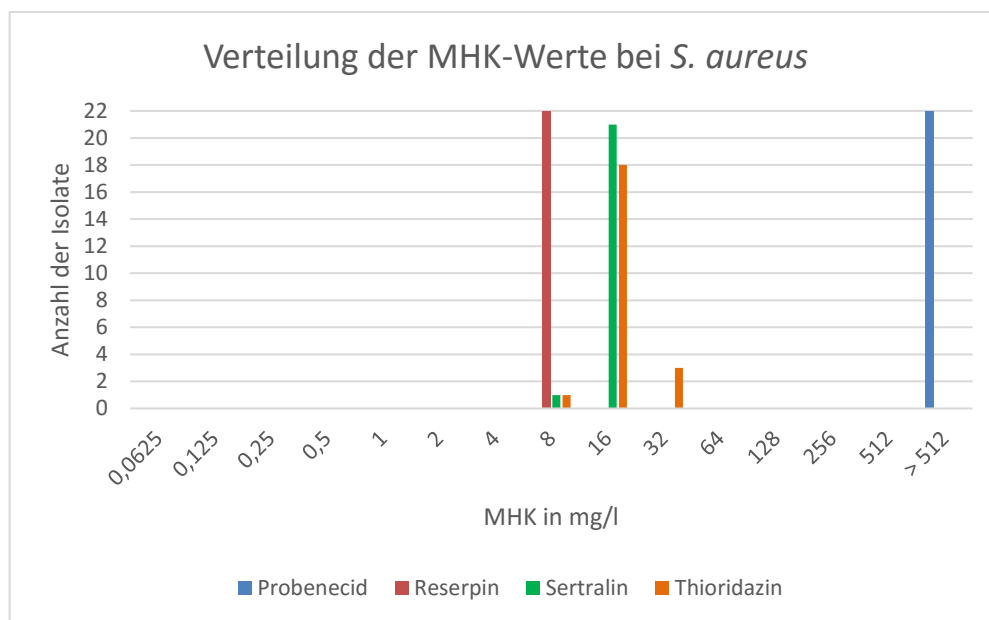


Abbildung 17: Verteilung der MHK-Werte bei *S. aureus*

Das Diagramm zeigt die Verteilung der MHK-Werte der EPI's für *E. faecalis*. Diese ist für Reserpin zu vier Fünftel bei 8 mg/l und zu einem Fünftel bei 16 mg/l. Sertralin und Thioridazin weisen zwar dieselben MHK-Werte auf, diese sind jedoch hier anders verteilt. Probenecid weist mit größer als 512 mg/l für alle Isolate die größten MHK-Werte auf.

5.2 GO PubMed

Dieses Unterkapitel soll einen Überblick über die vorhandene Literatur liefern und anschließend einen Vergleich der aufgefundenen Literatur mit den experimentellen Daten ermöglichen.

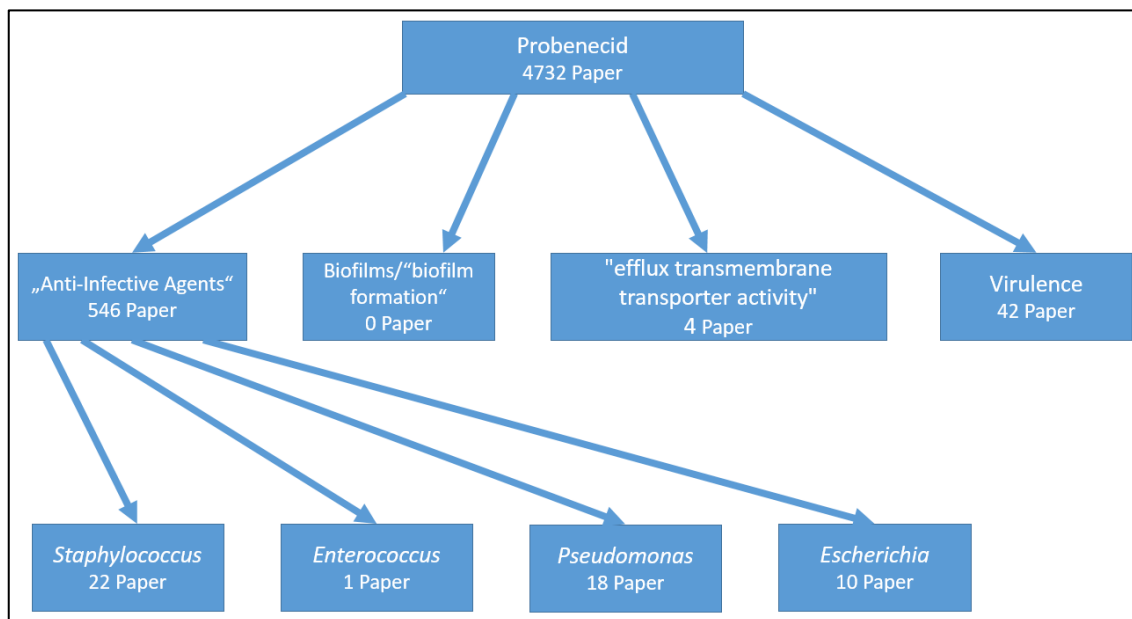


Abbildung 18: Übersicht der Recherche für Probenecid

Die Abbildung zeigt die Anzahl der mit GOPubMed aufgefundenen Veröffentlichungen für Probenecid mit den jeweiligen Suchbegriffen. Die Pfeile stellen dabei Verknüpfungen dar, bei der alle miteinander verbundenen Begriffe in einer Veröffentlichung vorkommen müssen. So waren für Probenecid 4732 wissenschaftliche Veröffentlichungen vorhanden, sollten diese auch noch „Anti-Infective Agents“ enthalten, sank die Anzahl auf 546 Paper. Wurde diesen beiden Suchbegriffen noch die Spezies Staphylokokken zugeordnet, ließ sich die Anzahl der Paper auf 22 eingrenzen.

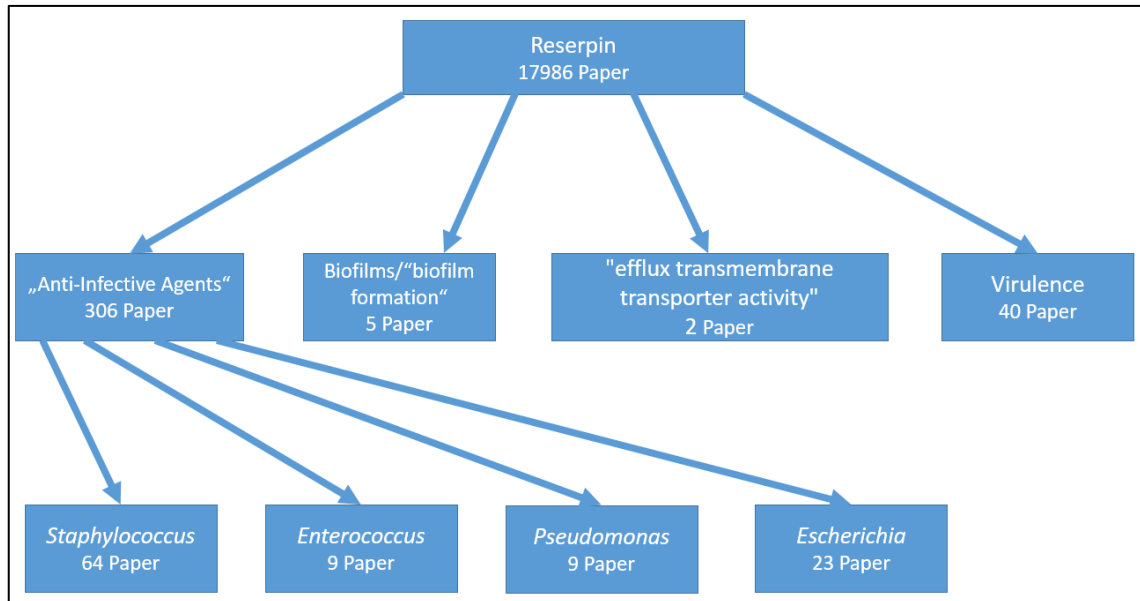


Abbildung 19: Übersicht der Recherche für Reserpin

Die Abbildung stellt die Anzahl der mit GOPubMed aufgefundenen Veröffentlichungen mit den jeweiligen Suchbegriffen für Reserpin dar. Die Pfeile stellen dabei Verknüpfungen dar, bei der alle miteinander verbundenen Begriffe in einer Veröffentlichung vorkommen müssen. Bei Reserpin waren 17986 wissenschaftliche Veröffentlichungen vorhanden. In Kombination mit „Anti-Infective Agents“ sank die Anzahl auf 306. Wurde der Kombination noch die Spezies der Enterokokken zugewiesen, reduzierte sich die Anzahl auf neun Veröffentlichungen.

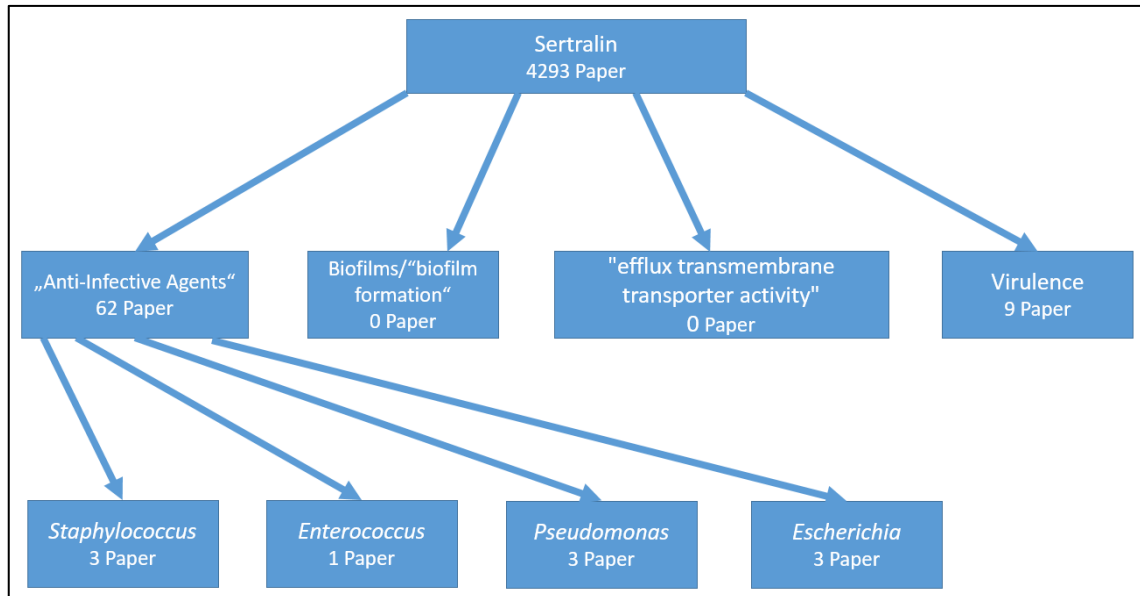


Abbildung 20: Übersicht der Recherche für Sertralin

Die Abbildung zeigt die Anzahl der mit GOPubMed aufgefundenen Veröffentlichungen für Sertralin mit den jeweiligen Suchbegriffen. Alle miteinander verbundenen Begriffe müssen in einer Veröffentlichung vorkommen. Diese sind durch Pfeile miteinander verknüpft. So wurden für Sertralin 4293 wissenschaftliche Veröffentlichungen gefunden, sollten diese auch noch „Anti-Infective Agents“ enthalten, reduzierte sich die Anzahl auf 62 Paper. Wurde diesen Suchbegriffen noch die Spezies Staphylokokken zugeordnet, konnte die Anzahl der Veröffentlichungen auf drei eingegrenzt werden.

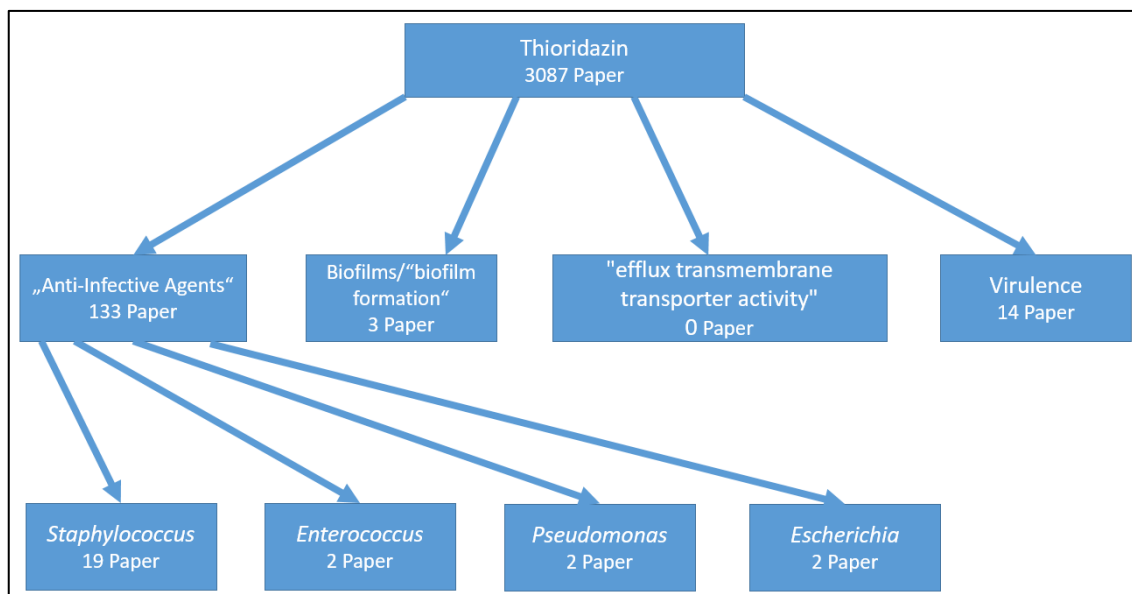


Abbildung 21: Übersicht der Recherche für Thioridazin

Das Bild stellt die Anzahl der mit GOPubMed aufgefundenen Veröffentlichungen für Thioridazin mit den jeweiligen Suchbegriffen dar. Die Pfeile stellen dabei Verknüpfungen dar, bei der alle miteinander verbundenen Begriff in einer Veröffentlichung vorkommen müssen. Für Thioridazin konnten 3087 wissenschaftliche Veröffentlichungen gefunden werden, wurden diese mit „Anti-Infective Agents“ kombiniert, reduzierte sich deren Anzahl auf 133 Paper. Wurde nun noch die Spezies Staphylokokken zugefügt, sank die Anzahl der Paper auf 19.

Insgesamt bringt die Einschränkung der Suchparameter eine deutlich geringere Anzahl an Veröffentlichungen hervor. Durch die Kombination über MeSH- und GO-Terme werden jedoch verschiedene Bedeutungen eines Terms zugelassen. So sind bei „Anti-Infective Agents“ gleichzeitig „Anti-Bacterial Agents“ mit in die Suche eingebunden. Dies ermöglicht eine entsprechende Flexibilität bei der Suche nach relevanten Papern.

Die Suche führte zu folgenden MHK-Verteilungen:

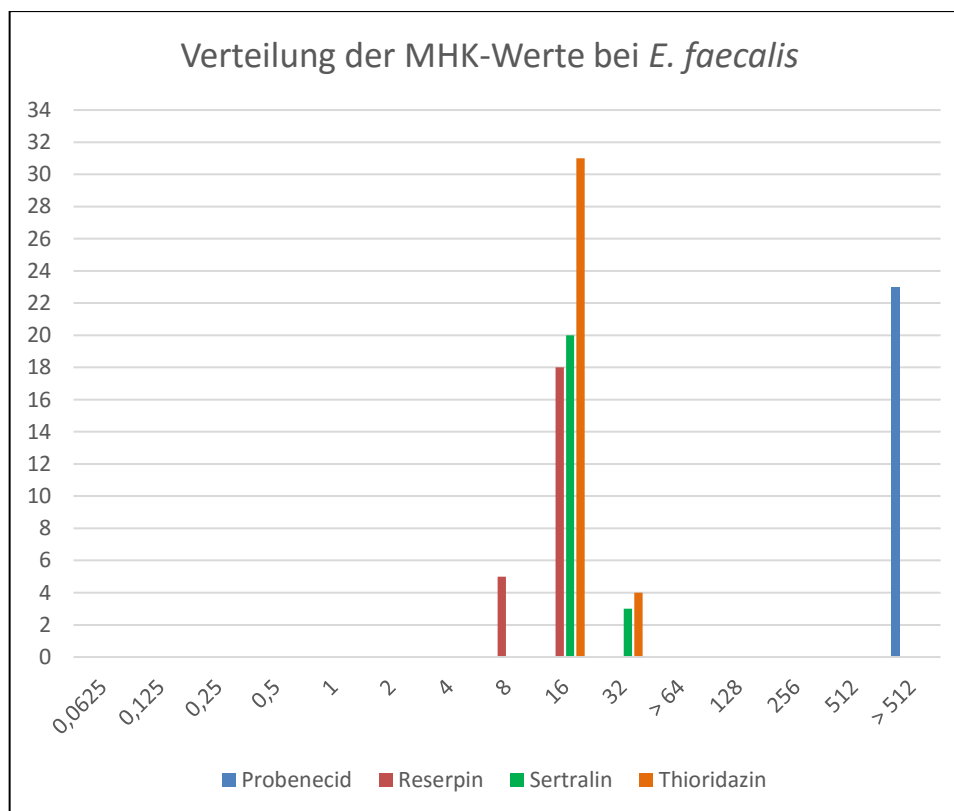


Abbildung 22: Verteilung der MHK-Werten für *E. faecalis* anhand von experimentellen Daten und Literaturwerten

Zu den bereits experimentell generierten Daten für *E. faecalis* wurden die Daten aus der Literaturrecherche [Rahbar et al., 2010; Hendricks et al., 2005] hinzugefügt. Die Gesamtzahl der untersuchten Isolate beträgt 35, jedoch weisen die *E. faecalis*-Isolate aus der Literatur nur MHK's für Thioridazin auf. Das Verhältnis der MHK-Werte für Thioridazin verschiebt sich zugunsten von 16 mg/ml.

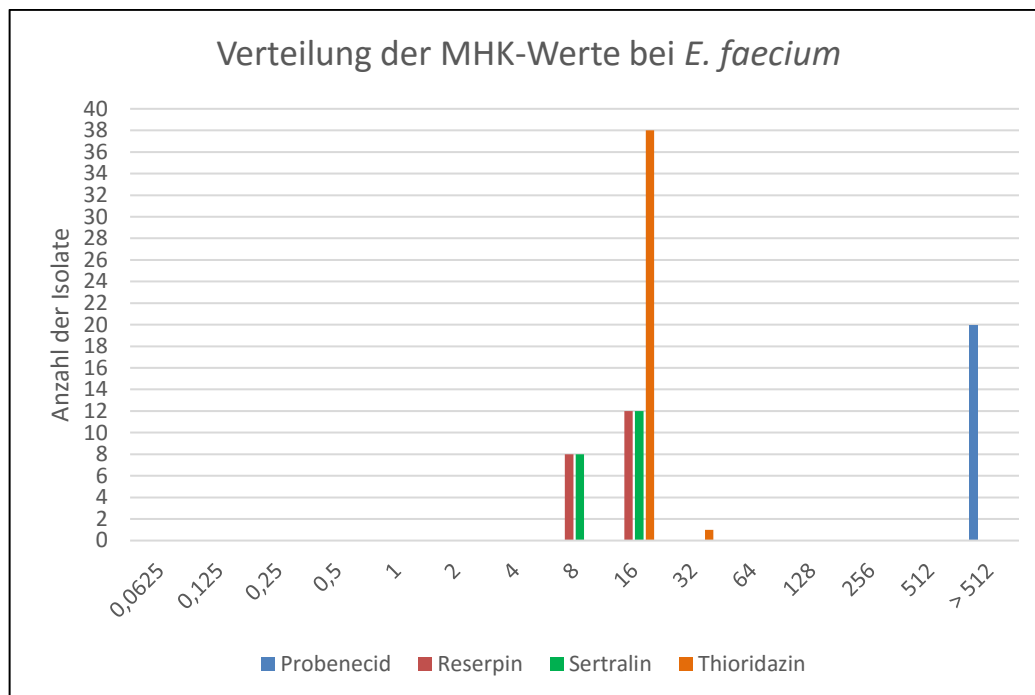


Abbildung 23: Verteilung der MHK-Werten für *E. faecium* anhand von experimentellen Daten und Literaturwerten

Zu den bereits experimentell generierten Daten für *E. faecium* wurden die Daten aus der Literaturrecherche [Rahbar et al., 2010; Hendricks et al., 2005] hinzugefügt. Die Gesamtzahl der untersuchten Isolate beträgt 39, jedoch weisen die *E. faecium*-Isolate aus der Literatur nur MHK's für Thioridazin auf. Das Verhältnis der MHK-Werte für Thioridazin verschiebt sich zugunsten von 16 mg/ml.

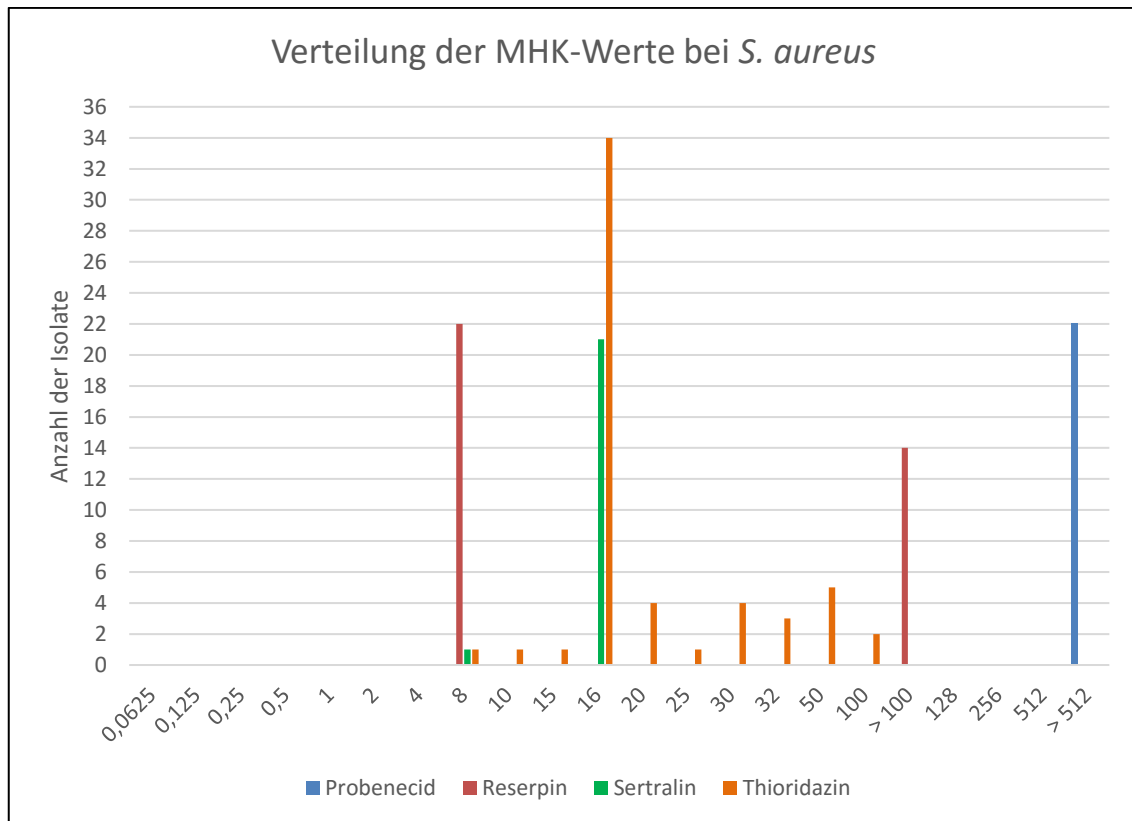


Abbildung 24: Verteilung der MHK-Werten für *S. aureus* anhand von experimentellen Daten und Literaturwerten

Zu den bereits experimentell generierten Daten für *S. aureus* wurden die Daten aus der Literaturrecherche [Kristiansen et al., 2003; Kaatz et al., 2003; Hendricks et al., 2003; Martins et al., 2004] hinzugefügt. Die Gesamtzahl der untersuchten Isolate beträgt 54, jedoch weisen die *S. aureus*-Isolate aus der Literatur nur MHK's für Reserpin und Thioridazin auf. Dabei fällt auf, dass die MHK-Werte für Reserpin in der Literatur deutlich höher sind als in den Experimenten. Bei Thioridazin gibt es Werte, die deutlich abweichen, aber auch Werte, die übereinstimmen. Ein Teil der Abweichungen ist darauf zurückzuführen, dass andere Methoden für die MHK-Bestimmung angewandt wurden, daher andere Abstufungen der Werte verwendet wurden. Die MHK-Werte für Thioridazin liegen sowohl zwischen den experimentellen Werten als auch darüber. Insgesamt weisen die MHK-Werte für Thioridazin mit den Literaturwerten eine größere Verteilung auf.

5.3 Biofilm-Anzucht und Bestimmung der MBIK

Nach 24 Stunden war ein Bakterienwachstum in einigen Kavitäten der Titerplatte sichtbar (siehe Abbildung 25).

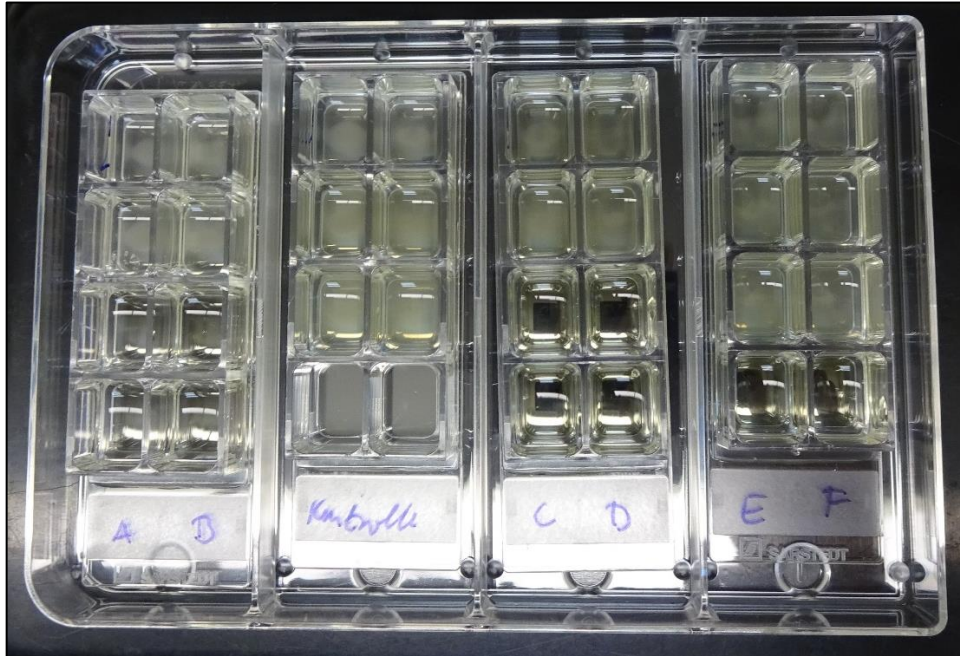


Abbildung 25: Biofilm-Anzucht nach 24 Stunden

Auf dem Foto sind unterschiedliche Trübungen nach 24 Stunden Wachstum bei den einzelnen Kavitäten erkennbar. Bei A handelt es sich um *S. aureus* Va 17999 und bei B um *S. aureus* Va 32261. Isolat A befindet sich bei der Kontrolle in der linken oberen Kavität, während Isolat B in der rechten oberen Kavität angezogen wurde. In der Reihe darunter befindet sich links Isolat C und rechts Isolat D. In der unteren bewachsenen Reihe wurde links Isolat E und rechts Isolat F angezogen. Bei C handelt es sich um *E. faecium* Va 12812 und bei D um *E. faecium* Va 14763. *E. faecalis* BK 1653 wurde in Reihe E und *E. faecalis* BK 6886/2 in Reihe F pipettiert. Bei den Isolaten A bis F wurde in der obersten Reihe Probenecid mit einer Endkonzentration von 375 µg/ml hinzugegeben, darunter Reserpin mit einer Endkonzentration von 0,625 µg/ml. In der Reihe unter Reserpin wurde Sertralin mit einer Endkonzentration von 25 µg/ml hinzugegeben und in die unterste Reihe wurde Thioridazin mit einer Endkonzentration von 75 µg/ml pipettiert. In jeder Kavität befinden sich je 300 µl der Bakteriensuspension, welche die jeweiligen Zusätze enthalten, bzw. in den Wachstumskontrollen ohne Zusätze im Medium.

Nach 48 Stunden Wachstum wurden die folgenden Mikroskopie-Bilder aufgenommen.

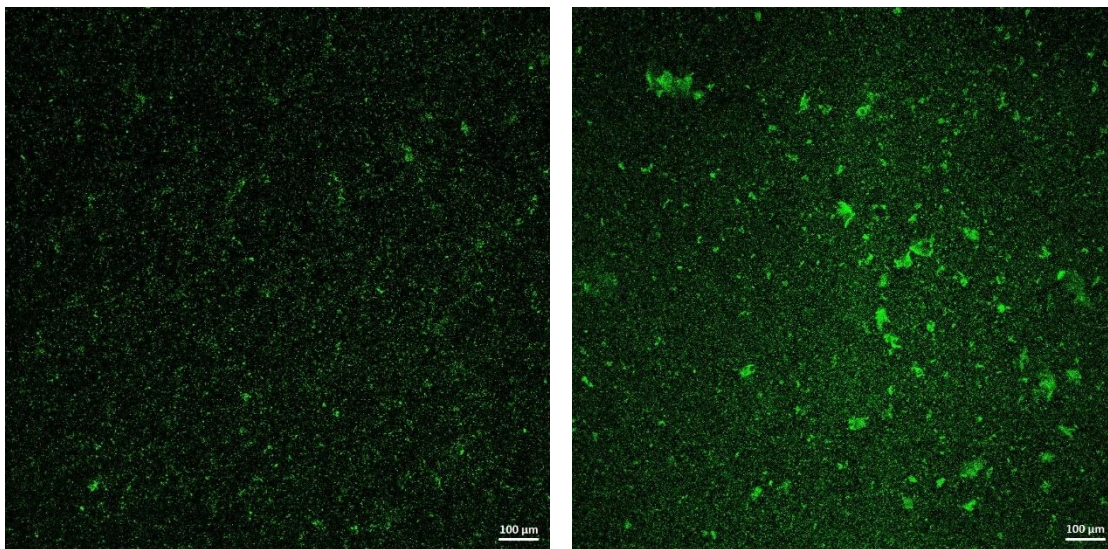
E. faecalis

Abbildung 26: *E. faecalis* BK 1653, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung: 100x

Bei dem mit Probenecid behandelten Isolat BK 1653 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle sichtbar.

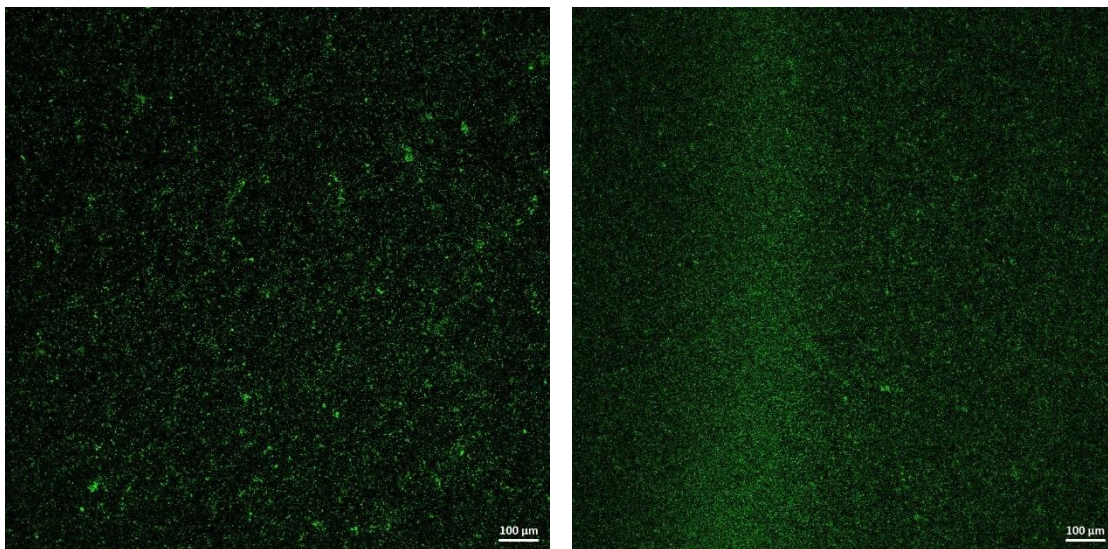


Abbildung 27: *E. faecalis* BK 1653, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Reserpin (rechts), Vergrößerung: 100x

Bei dem mit Reserpin behandelten Isolat BK 1653 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

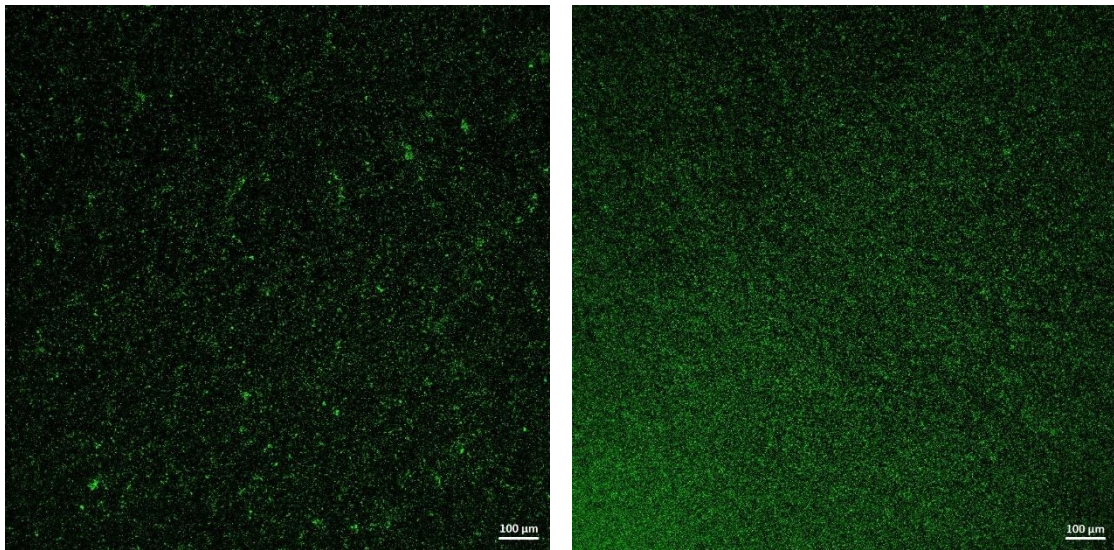


Abbildung 28: *E. faecalis* BK 1653, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertralin (rechts), Vergrößerung: 100x

Bei dem mit Sertralin behandelten Isolat BK 1653 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle sichtbar.

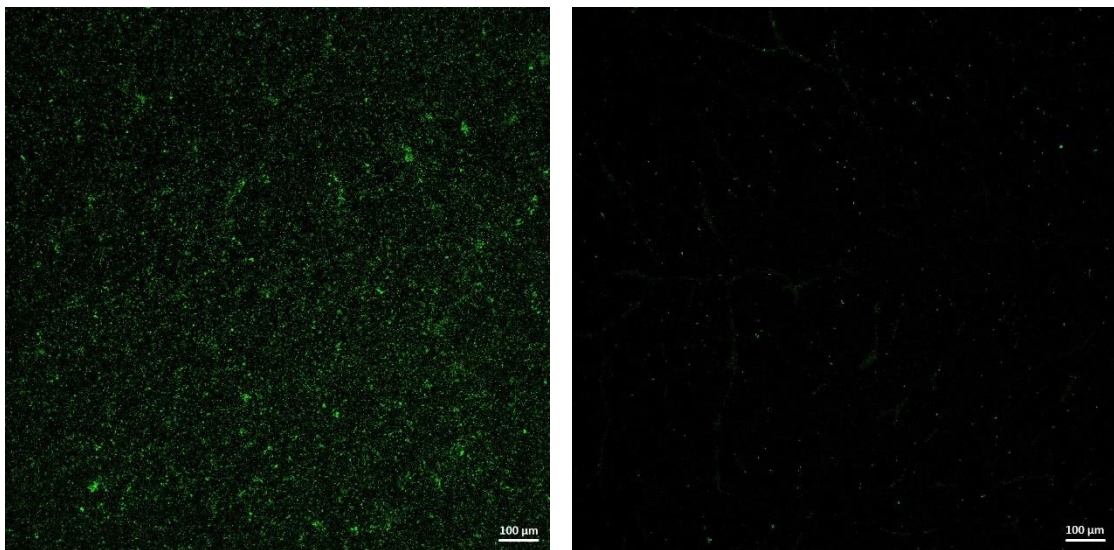


Abbildung 29: *E. faecalis* BK 1653, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung: 100x

Bei dem mit Thioridazin behandelten Isolat BK 1653 ist eine deutliche Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zu sehen.

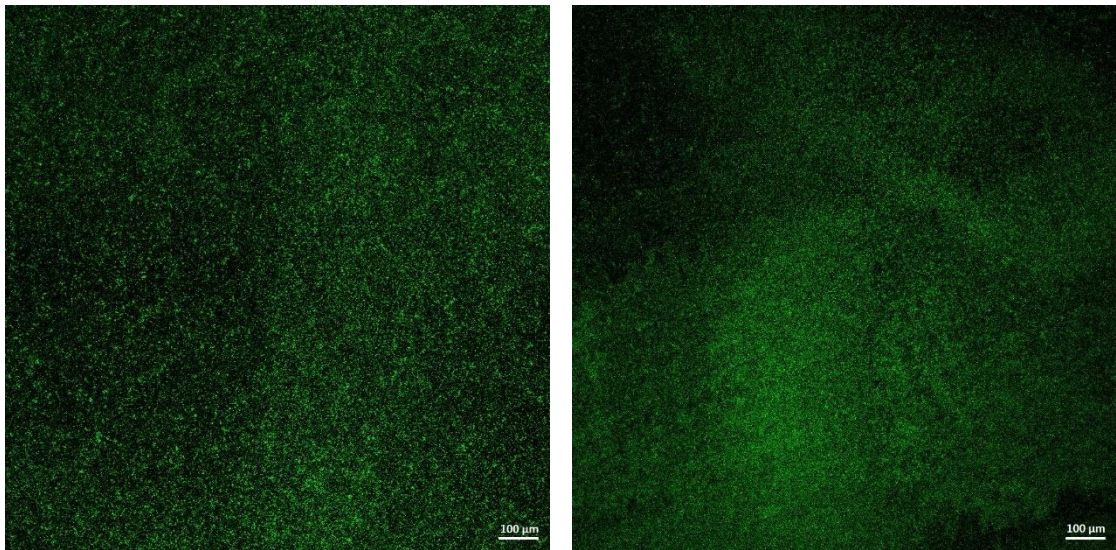


Abbildung 30: *E. faecalis* BK 6886/2, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Probenecid behandelten Isolat BK6886/2 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

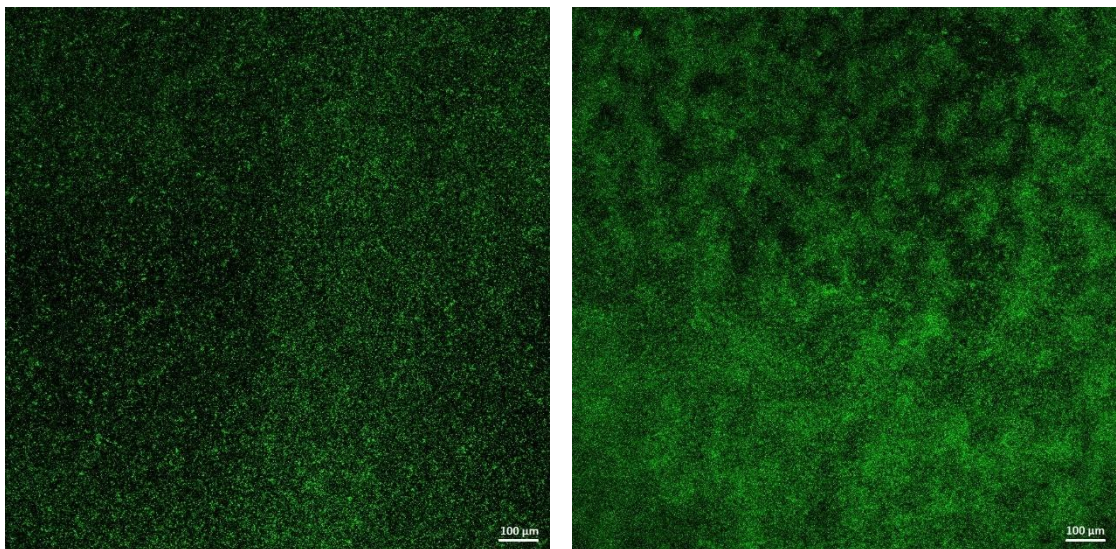


Abbildung 31: *E. faecalis* BK 6886/2, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Reserpin (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Reserpin behandelten Isolat BK6886/2 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

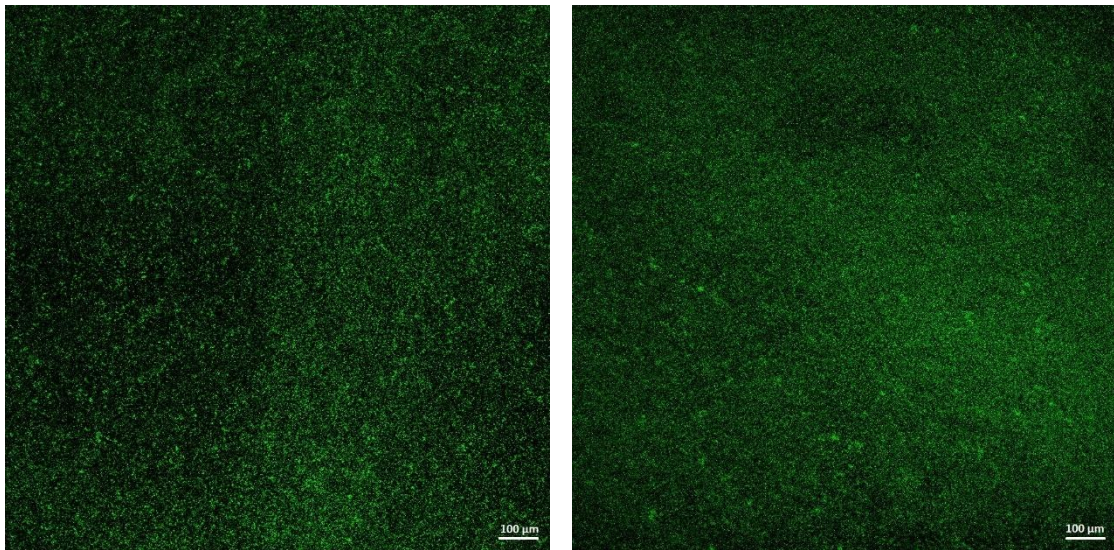


Abbildung 32: *E. faecalis* BK 6886/2, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertraline (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Sertraline behandelten Isolat BK6886/2 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

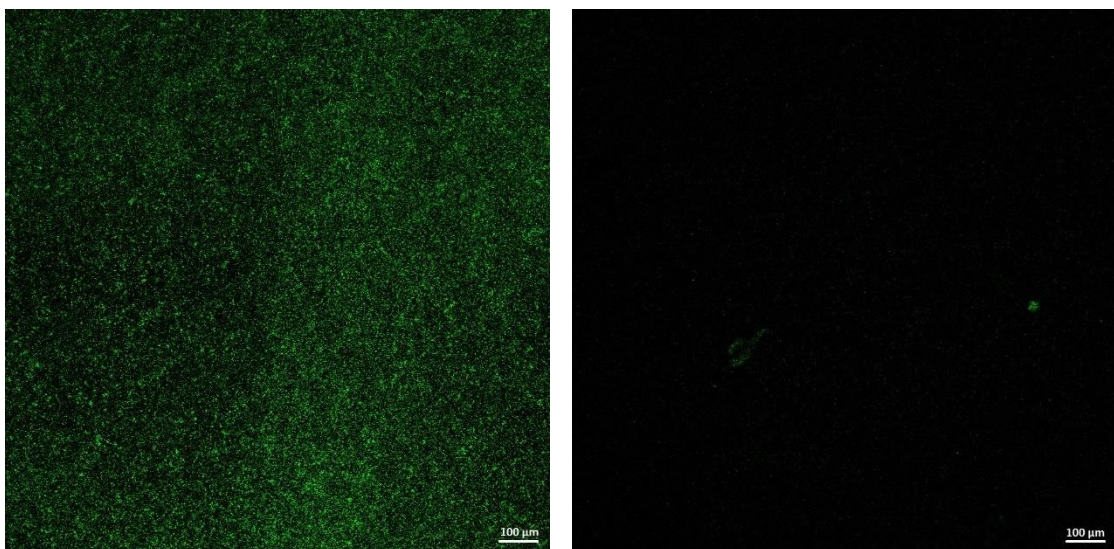


Abbildung 33: *E. faecalis* BK 6886/2, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazine (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Thioridazine behandelten Isolat BK6886/2 ist eine deutliche Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle sichtbar.

Für *E. faecalis* war bei beiden Isolaten lediglich bei der Behandlung mit Thioridazine ein eingeschränktes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

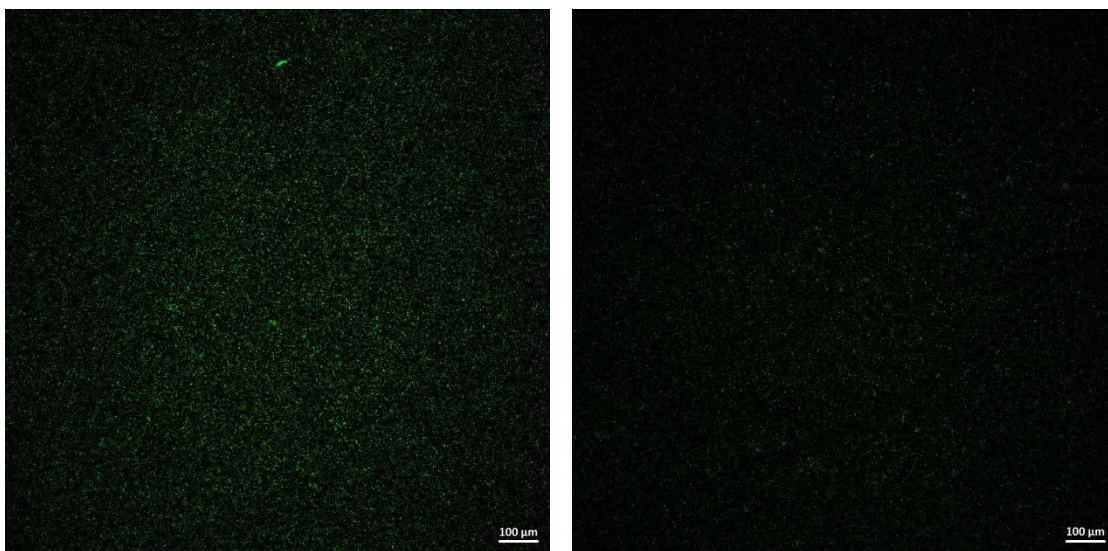
E. faecium

Abbildung 34: *E. faecium* Va 12812, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Probenecid behandelten Isolat Va 12812 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

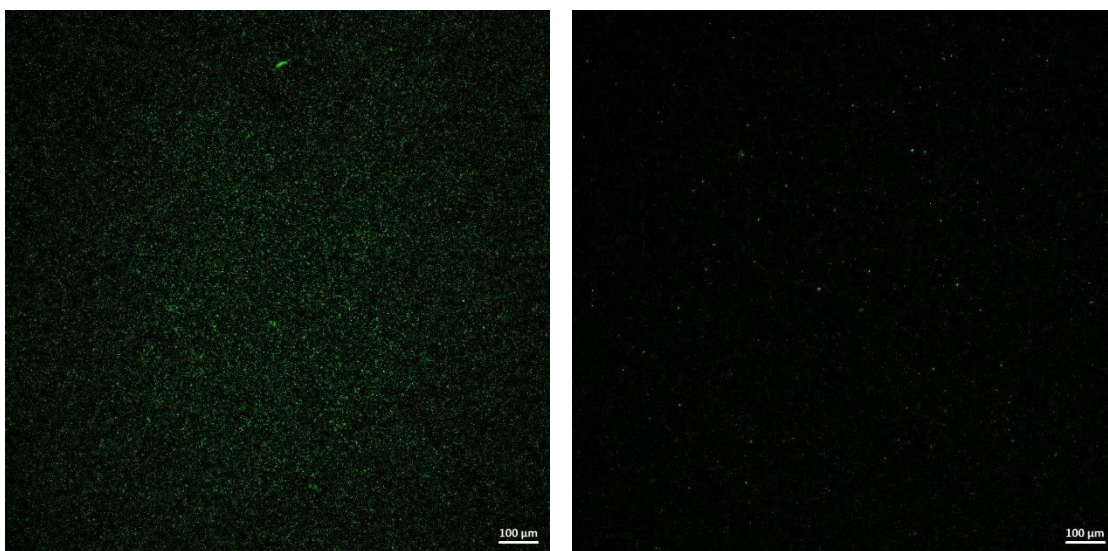


Abbildung 35: *E. faecium* Va 12812, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertalin (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Sertralin behandelten Isolat Va 12812 ist eine deutliche Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zu sehen.

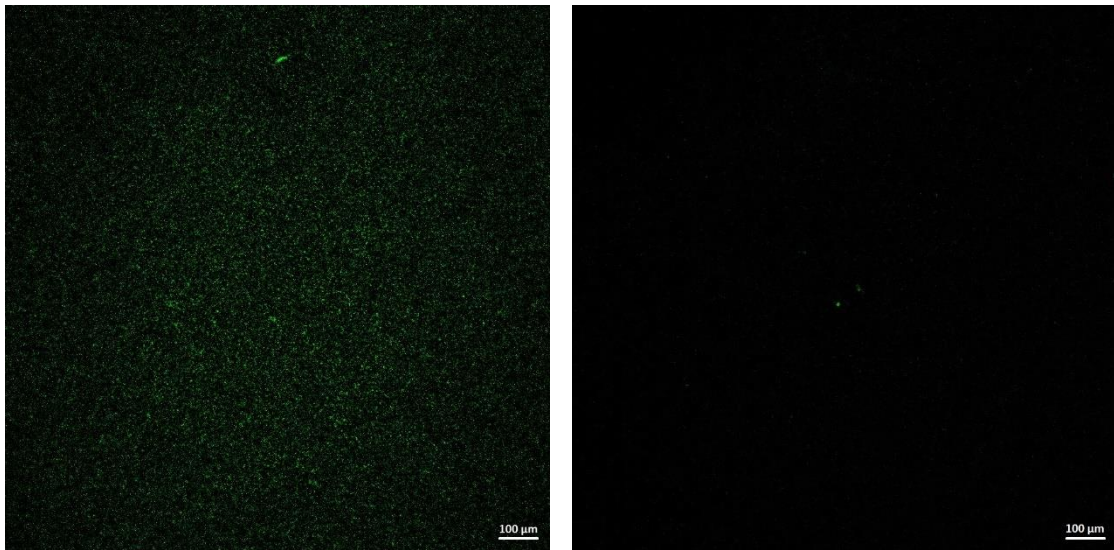


Abbildung 36: *E. faecium* Va 12812, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Thioridazin behandelten Isolat Va 12812 ist eine deutliche Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

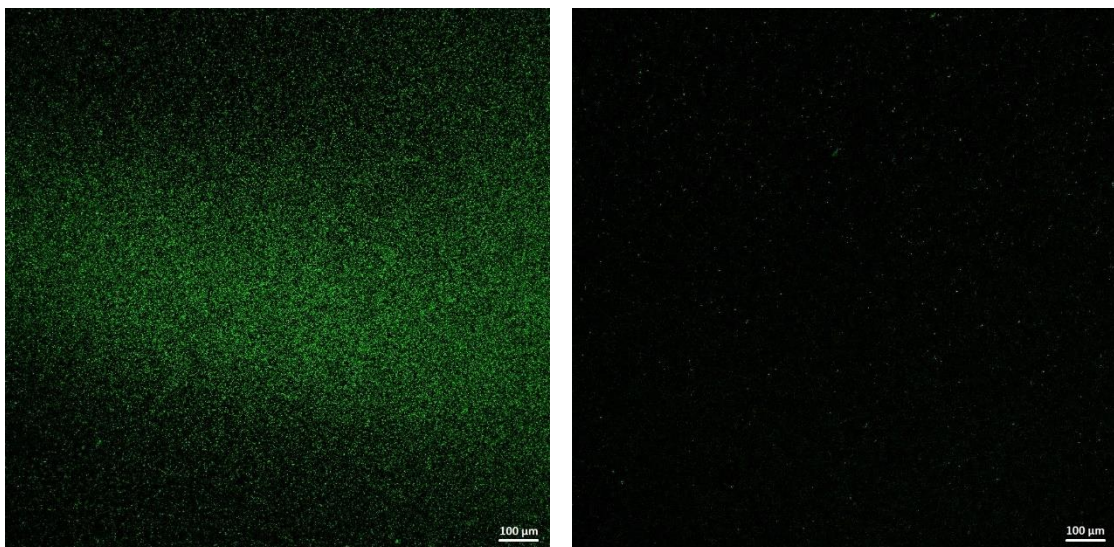


Abbildung 37: *E. faecium* Va 14763, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertralin (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Sertralin behandelten Isolat Va 14763 ist eine deutliche Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

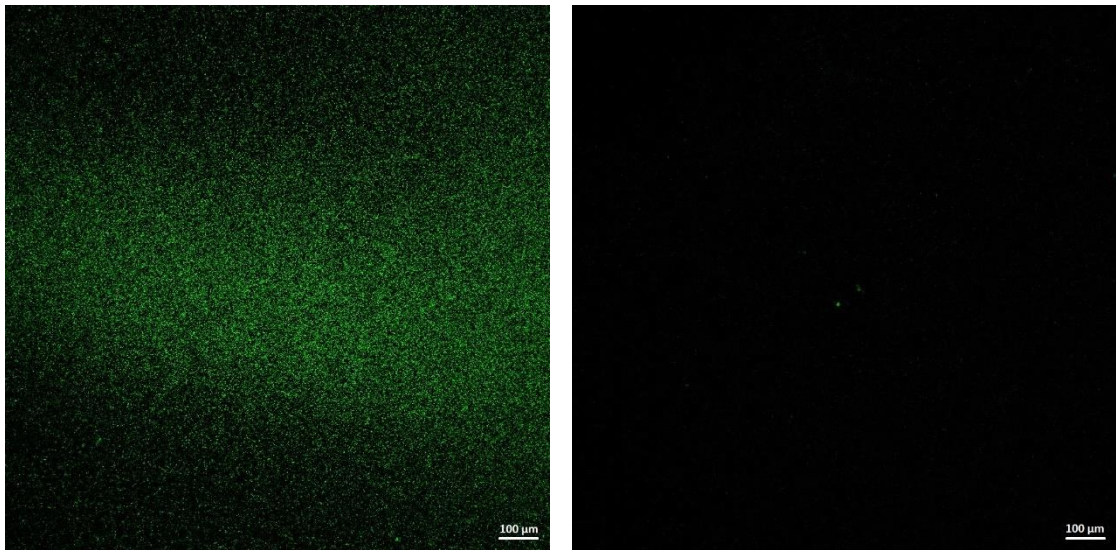


Abbildung 38: *E. faecium* Va 14763, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Thioridazin behandelten Isolat Va 14763 ist eine deutliche Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle sichtbar.

Für *E. faecium* konnte bei beiden Isolaten sowohl bei der Behandlung Sertralin als auch mit Thioridazin ein eingeschränktes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

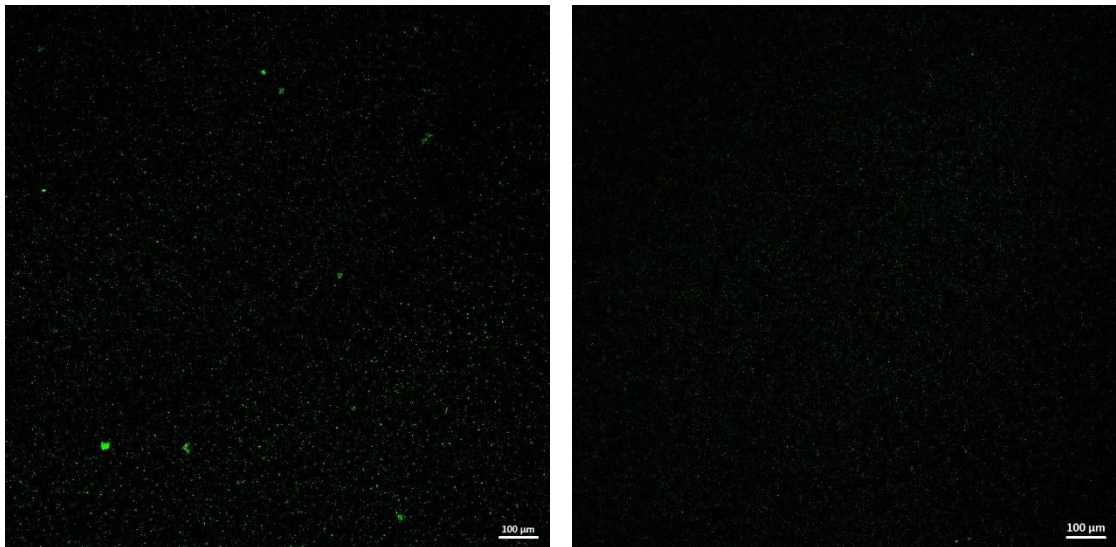
S. aureus

Abbildung 39: *S. aureus* Va 17999, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Probenecid behandelten Isolat Va 17999 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

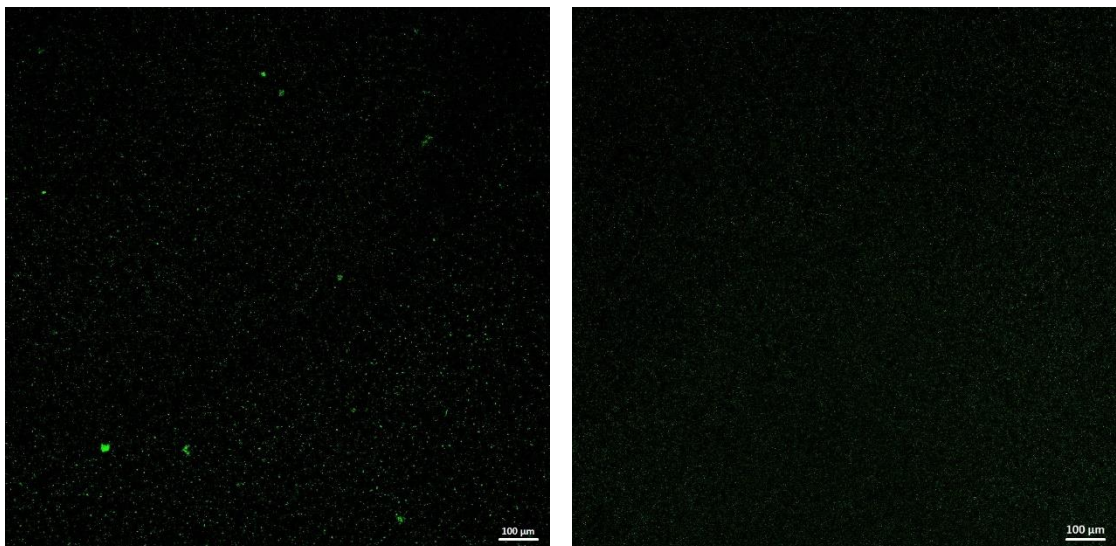


Abbildung 40: *S. aureus* Va 17999, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Reserpin (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Reserpin behandelten Isolat Va 17999 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle feststellbar.

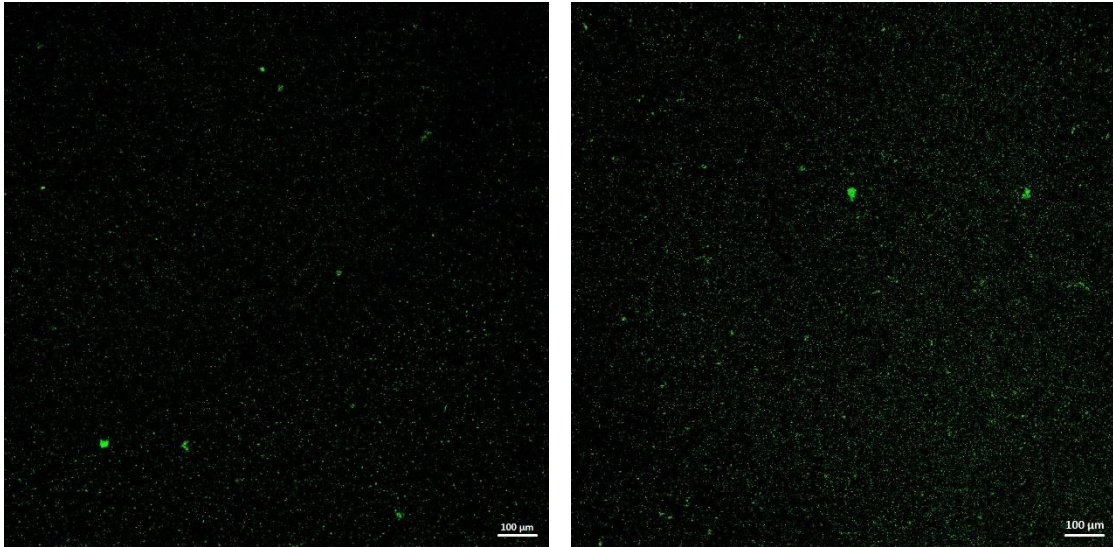


Abbildung 41: *S. aureus* Va 17999, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertraline (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Sertraline behandelten Isolat Va 17999 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zu sehen.

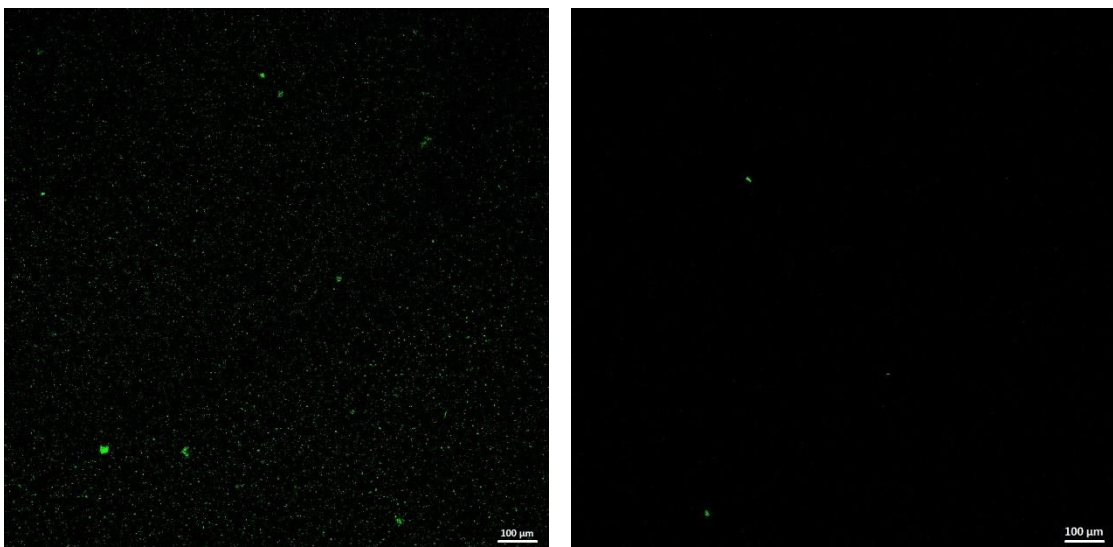


Abbildung 42: *S. aureus* Va 17999, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazine (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Thioridazine behandelten Isolat Va 17999 ist eine deutliche Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

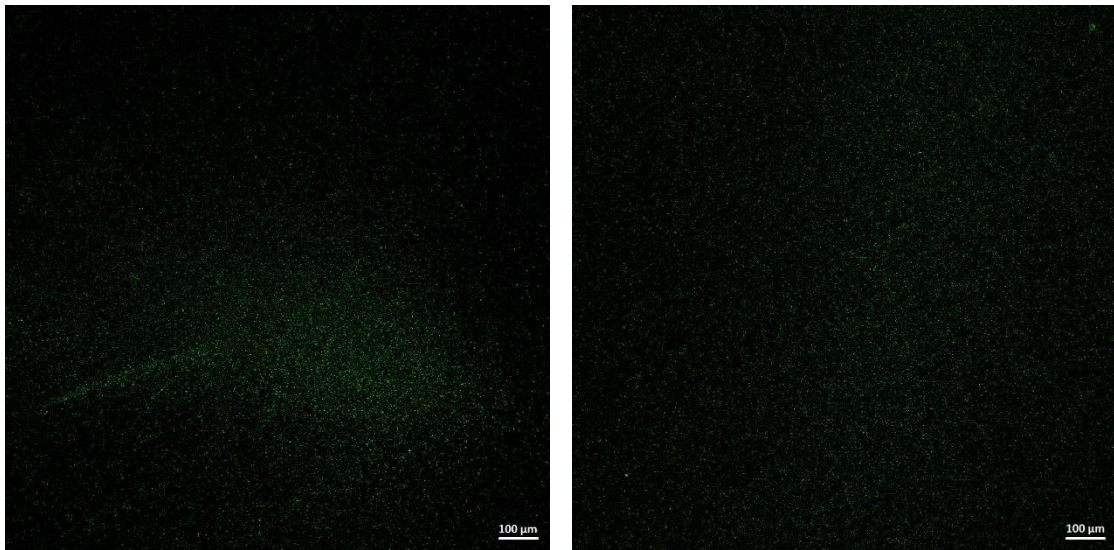


Abbildung 43: *S. aureus* Va 32261, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Probenecid (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Probenecid behandelten Isolat Va 32261 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zu sehen.

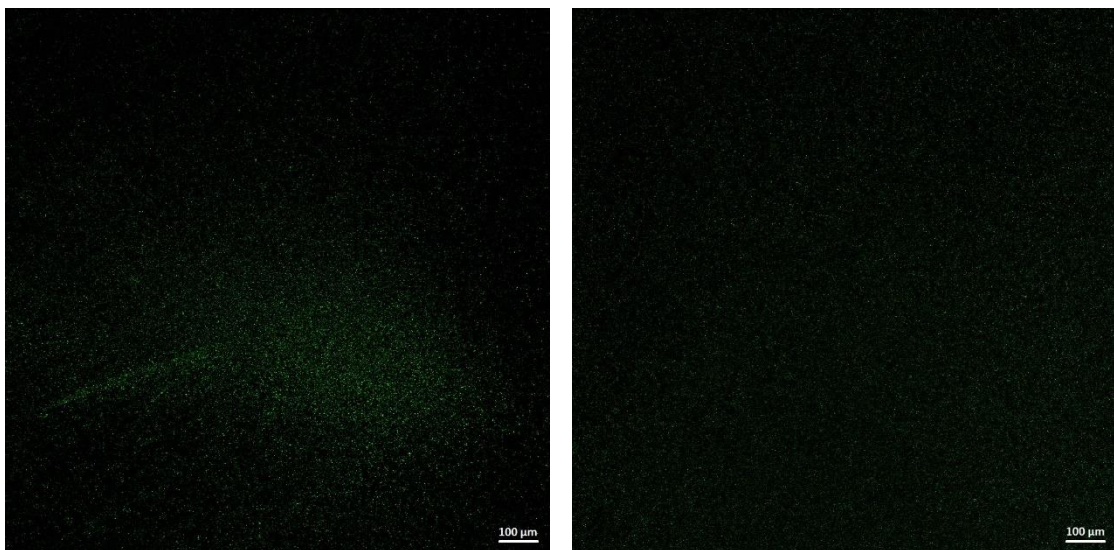


Abbildung 44: *S. aureus* Va 32261, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Reserpin (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Reserpin behandelten Isolat Va 32261 ist keine Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

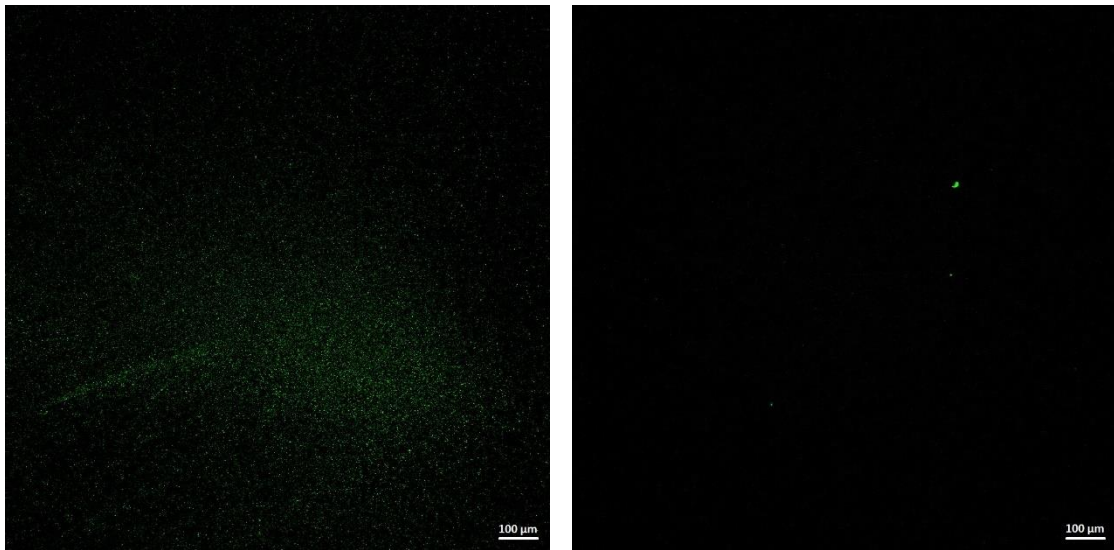


Abbildung 45: *S. aureus* Va 32261, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Sertraline (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Sertraline behandelten Isolat Va 32261 ist eine deutliche Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

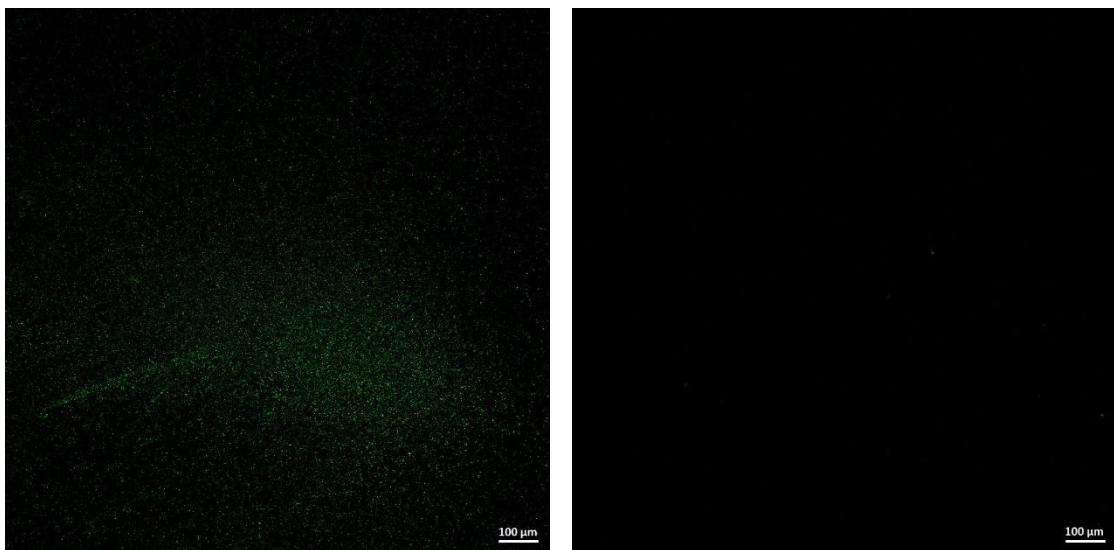


Abbildung 46: *S. aureus* Va 32261, Kontrolle (links) und nach der Behandlung mit Thioridazin (rechts), Vergrößerung 100x

Bei dem mit Thioridazin behandelten Isolat Va 32261 ist eine deutliche Einschränkung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle festzustellen.

Für *S. aureus* war bei beiden Isolaten lediglich bei der Behandlung mit Thioridazin ein eingeschränktes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Bei Sertraline war nur eine Einschränkung im Wachstum bei Isolat Va 32261 zu erkennen.

5.4 Auswertung der RAPD-PCR

5.4.1 Etablierung der RAPD-PCR

E. faecalis

Im Gelbild war zu erkennen, dass sich die Banden der beiden getesteten Isolate bei den Primern ERIC1R und CC1 unterscheiden. Für AP4 und M13R2 sowie für die Kombination aus AP4 und ERIC1R waren bei den verwendeten Isolaten keine Unterschiede sichtbar.

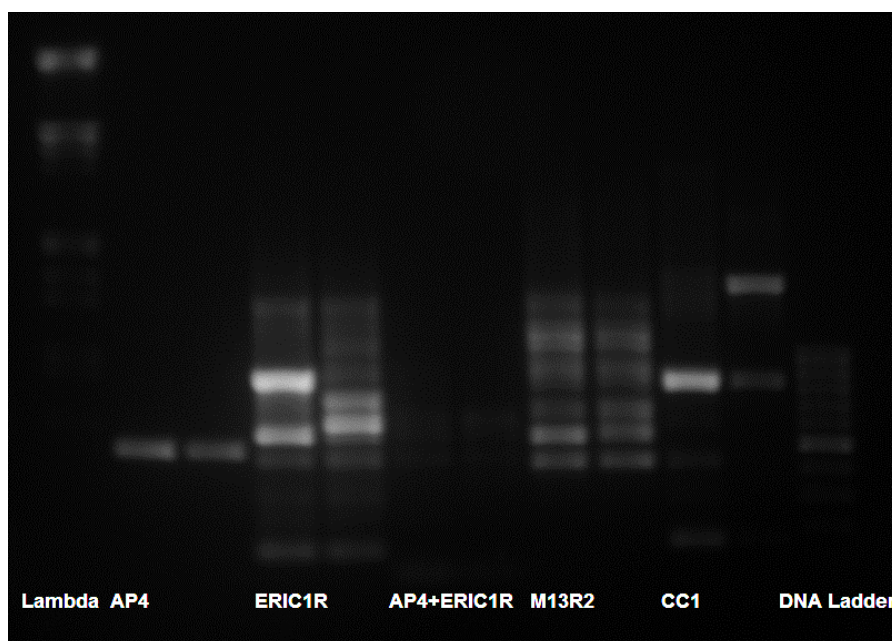


Abbildung 47: Etablierung der RAPD-PCR für *E. faecalis* BK 1565 und BK 1653

Die Abbildung zeigt die *E. faecalis*-Isolate BK 1565 (immer links) und BK 1653 (immer rechts), welche mit den Primern AP4, ERIC1R, AP4+ERIC1R, M13R2 und CC1 getestet wurden. Zum Vergleich der Bandengrößen wurden die beiden Marker λ DNA, EcoRI/HindIII und GeneRuler™ 100 kb DNA Ladder eingesetzt. Anhand des Gelbildes ist keine Unterscheidung der beiden Stämme mittels der Primer AP4 und M13R2 sowie der Primerkombination AP4 und ERIC1R möglich. Bei den Primer ERIC1R und CC1 sind unterschiedliche RAPD-Banden sichtbar, daher eignen sich diese beiden Primer für die weiteren Experimente.

E. faecium

Bei den Primern AP4 und ERIC1R konnten im Gelbild mit den beiden verwendeten Isolaten UR 6479 und UR 6112 keine Unterschiede festgestellt werden. Bei der Kombination dieser beiden Primer zeigten sich Unterschiede in der Helligkeit der

Banden. Beim Primer M13R2 waren unterschiedliche Banden erkennbar. Zu dem Primer CC1 kann keine Aussage bezüglich der Vergleichbarkeit der Banden getroffen werden, weil beim Stamm UR 6479 keine Banden im Gel zu sehen waren. Im Wiederholungsversuch wurde Stamm Va 14854 statt UR 6479 eingesetzt, auch mit diesem Isolat waren keine Banden bei CC1 sichtbar.

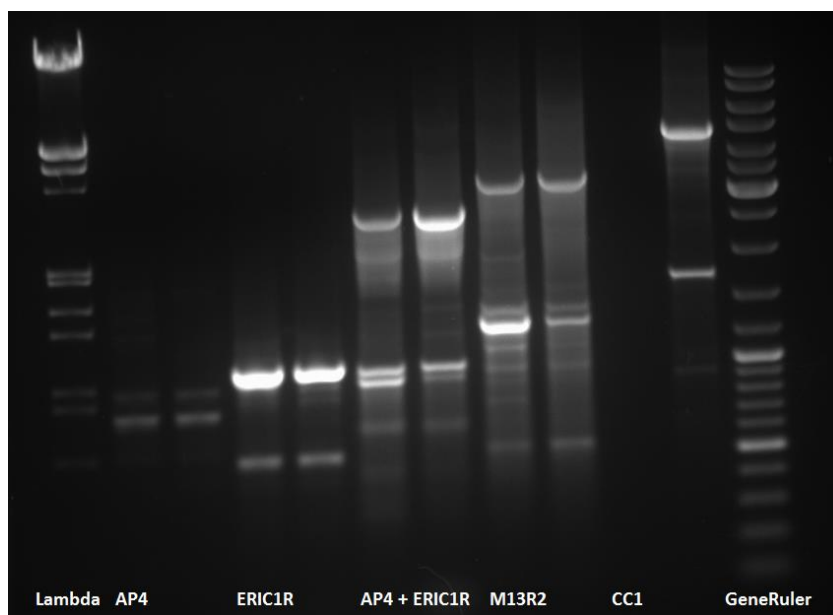


Abbildung 48: Etablierung der RAPD-PCR mit *E. faecium* UR 6479 und UR 6112

Auf das Gel wurde zunächst der Marker λ -DNA, EcoRI/HindIII aufgetragen, dann folgten die *E. faecium*-Isolate UR 6479 (immer links) und UR 6112 (immer rechts) mit den Primern AP4, ERIC1R, AP4 + ERIC1R, M13R2 und CC1. Dabei wies lediglich der Primer M13R2 ein gutes Diskriminierungsprofil auf. Ansonsten waren nur bei der Primerkombination aus AP4 und ERIC1R gute Unterschiede zwischen den beiden Stämmen erkennbar. Bei CC1 war für UR 6479 keine Bande sichtbar. Zum Schluss wurde der Marker Gene Ruler™ DNA Ladder aufgetragen.

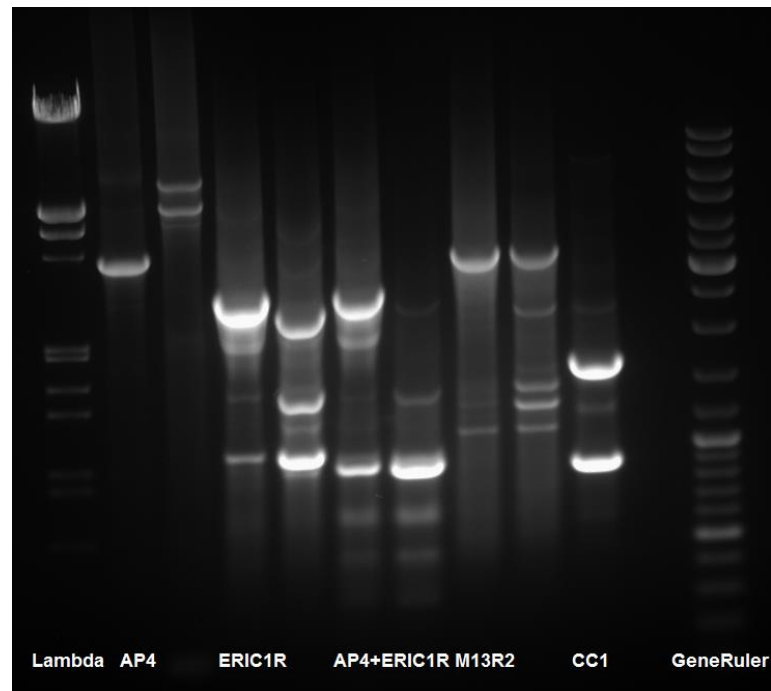


Abbildung 49: Etablierung der RAPD-PCR für *E. faecium* UR 6112 und Va 14854

Die beiden äußeren Banden sind die Marker λ -DNA, EcoRI/HindIII und Gene Ruler™ DNA Ladder. Innerhalb dieser Marker wurden die *E. faecium*-Isolate UR 6112 und Va 14854 mit den Primern AP4, ERIC1R, AP4 + ERIC1R, M13R2 und CC1 auf das Gel aufgetragen. Dabei wiesen die Primer M13R2, ERIC1R und AP4 sowie die Primerkombination AP4 + ERIC1R ein gutes Diskriminierungsprofil auf. Für Va 14854 war keine Bande beim Primer CC1 zu sehen.

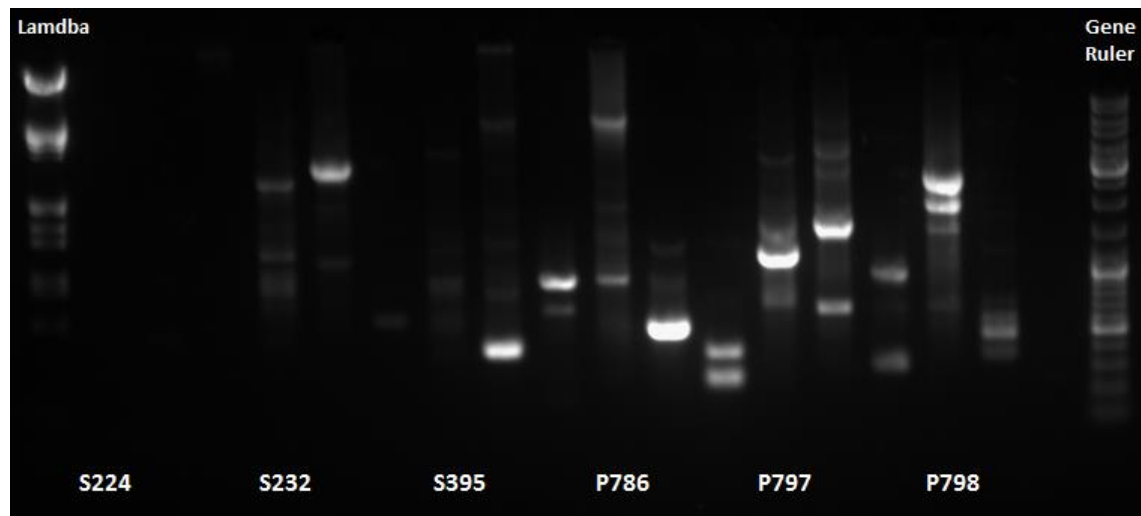
S. aureus

Abbildung 50: Etablierung der RAPD-PCR für *S. aureus* Va 17834 und Va 32261

Die beiden äußeren Banden sind die Marker λ -DNA, EcoRI/HindIII und Gene Ruler™ DNA Ladder. Bei jedem Primer wurde *S. aureus* Va 17834, Va 32261 und eine Negativkontrolle (von links beginnend) mitgeführt. Dabei lieferte der Primer S224 keine RAPD-Banden. Die Primer S232, S395, P786 und P797 wiesen Banden bei den Negativkontrollen auf, daher konnten diese Primer nicht für weitere Tests verwendet werden, obwohl sich die beiden Stämme unterschieden. Lediglich der Primer P798 lieferte eine negative Kontrolle mit destilliertem Wasser und ermöglichte eine Unterscheidung der RAPD-Banden bei den beiden getesteten Stämmen.

5.4.2 Vergleich der Isolate für die einzelnen Spezies

E. faecalis

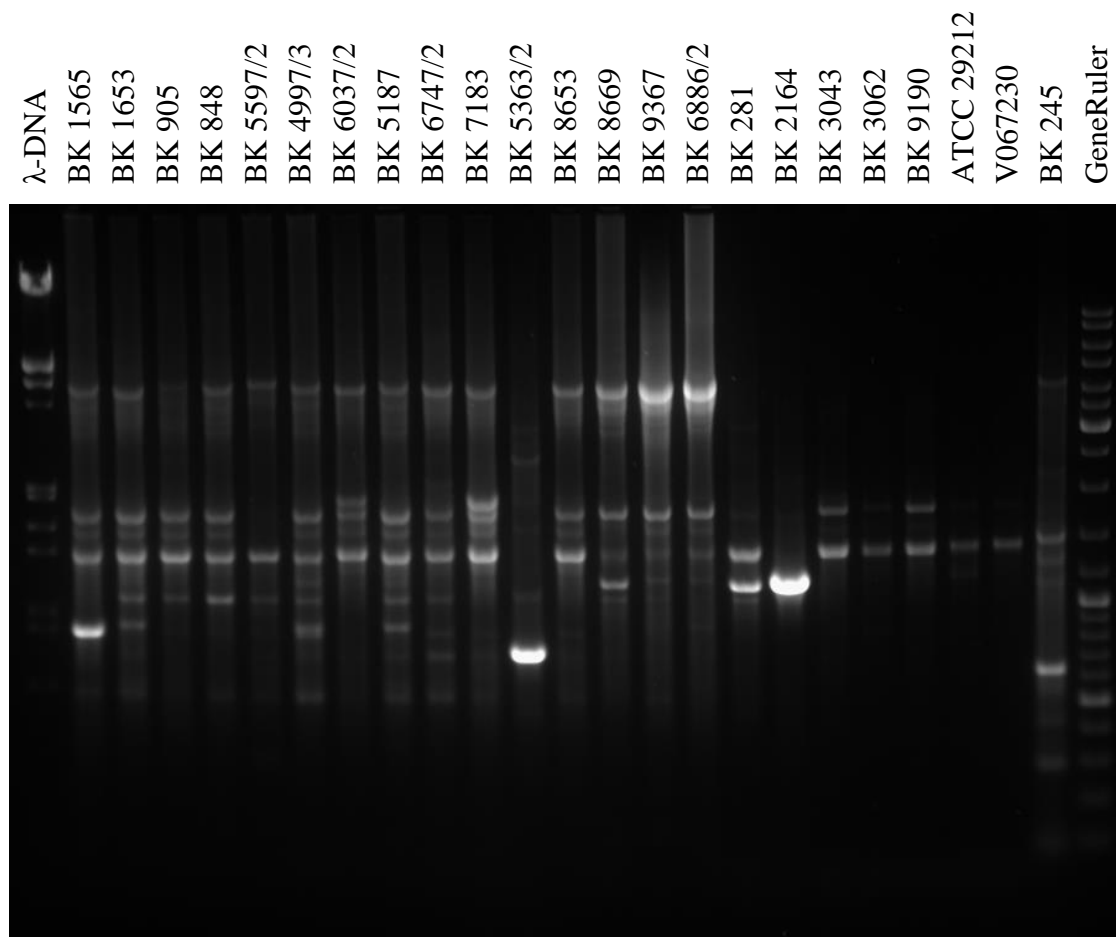


Abbildung 51: RAPD-PCR von 23 *E. faecalis*-Isolaten mit dem Primer ERIC1R

Das Gelbild zeigt die PCR-Produkte von 23 *E. faecalis*-Isolaten. Es gibt Banden, die bei einem Großteil der Isolate vorkommen. Ausnahmen bilden dabei die Isolate BK 5363/2 und BK 2164. Auf dem Bild ist außerdem erkennbar, dass die Isolate BK 281, BK 2164, BK 3034, BK 3062, BK 9190 und V067230 sowie der ATCC-Stamm 29212 deutlich weniger Banden aufweisen wie die anderen Isolate.

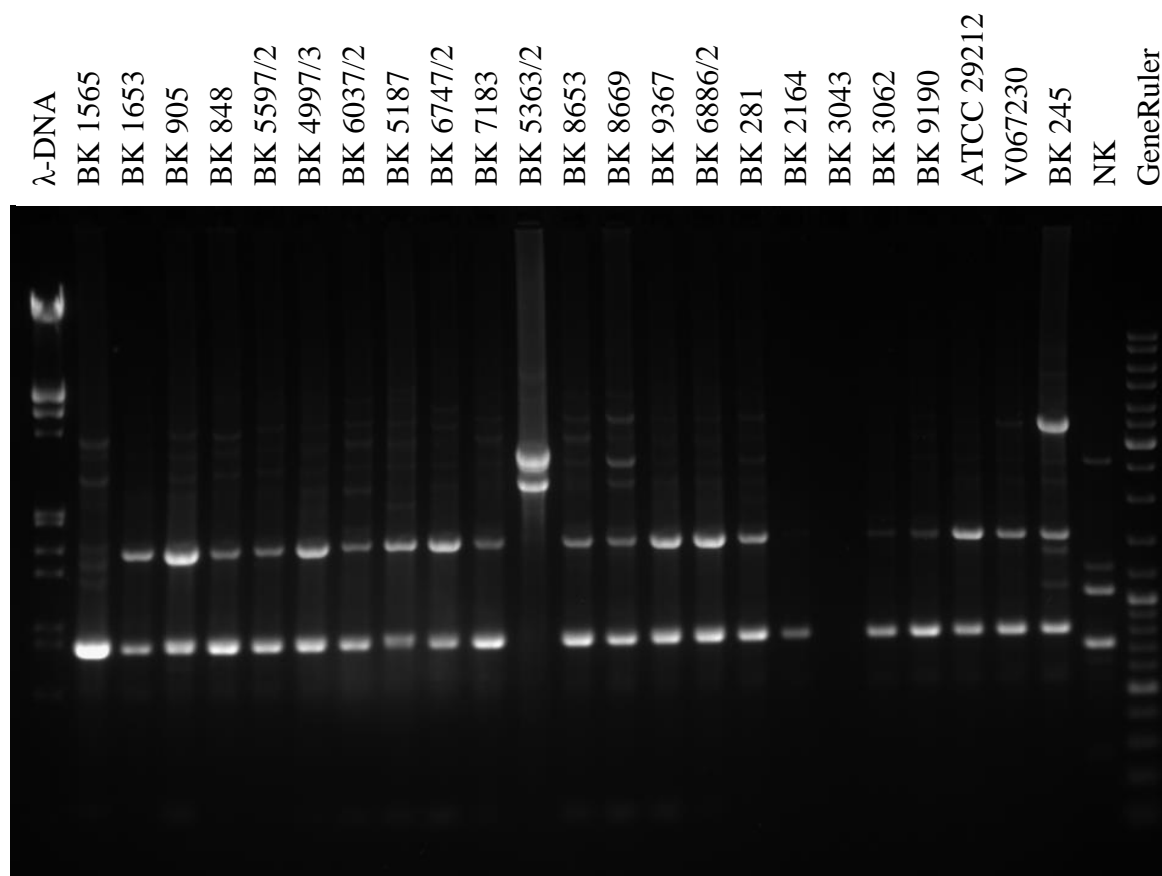


Abbildung 52: RAPD-PCR für 23 Isolate von *E. faecalis* mit dem Primer CC1

Das Gelbild zeigt die PCR-Produkte derselben Isolate wie in Abbildung 31, jedoch mit dem Primer CC1. Dabei fällt auf, dass bei BK 3043 keine Bande zu sehen ist und die beiden benachbarten Isolate BK 2164 und BK 3062 weisen schwächere Banden auf. BK 5363/2 zeigt ein komplett anderes Bandenmuster als die restlichen Isolate. Bei allen anderen Isolaten gibt es bei zwei Banden eine Übereinstimmung. Außerdem fällt bei der Negativkontrolle (NK) eine Verunreinigung auf. Diese stimmt jedoch nicht mit den Banden, die hauptsächlich bei den Isolaten vorkommen, überein.

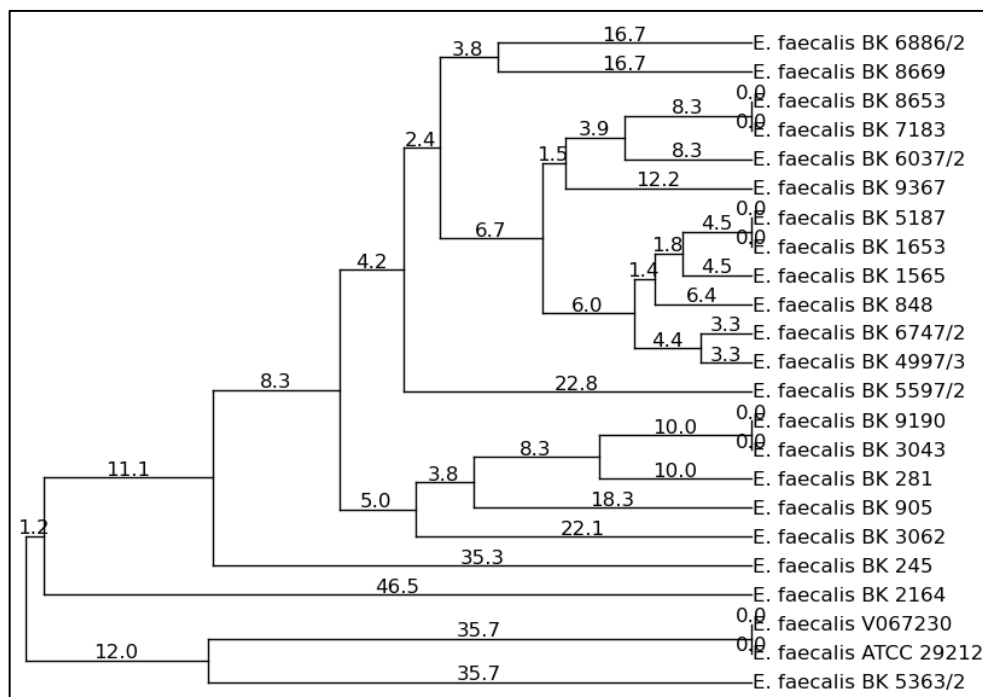


Abbildung 53: Dendrogramm zu *E. faecalis* mit dem Primer ERIC1R, erstellt mittels UPGMA

Für den Vergleich der Banden wurde der Threshold auf 12, die Filter width auf 2 und die Filter passes auf 10 im Programm PyElph 1.4 eingestellt. Für die Ermittlung der Distanzen wurde die Methode UPGMA angewendet. Die Isolate BK 8653 und BK 7183 sowie die Isolate BK 9190 und BK 3043 weisen jeweils keine Distanz zueinander auf. Ebenso war keine Distanz zwischen ATCC 29212 und V067230 vorhanden. Dabei fallen die Isolate BK 5187, BK 1653, BK 1565, BK 848, BK 6747/2 und BK 4997/3 durch kurze Distanzen zueinander auf. Mit etwas größerem Abstand zur genannten Gruppe lassen sich die Isolate BK 8653, BK 7183, BK 6037/2 und BK 9367 zuordnen. Eine weitere Gruppierung bilden die Isolate BK 9190 und BK 3043 mit BK 281, BK 905 und BK 3062. In dieser Gruppe sind die Distanzen jedoch größer als in den bisher genannten. Die Stämme ATCC 29212 und V067230 weisen mit BK 5363/2 die größte Distanz zu den anderen Isolaten auf.

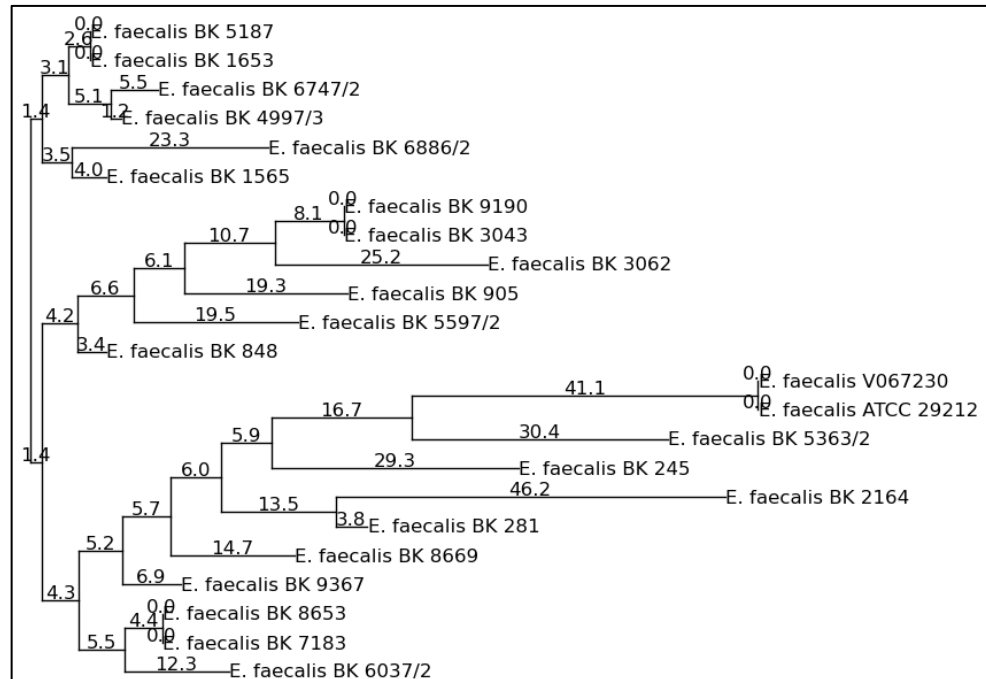


Abbildung 54: Dendrogramm zu *E. faecalis* mit dem Primer ERIC1R, erstellt mittels NJ

Im Programm PyElph 1.4 wurde der Threshold auf 12, die Filter width auf 2 und die Filter passes auf 10 eingestellt. Für die Ermittlung der Distanzen wurde die Methode Neighbour Joining ausgewählt. Eine Distanz von null zueinander weisen jeweils die Isolate BK 5187 und BK 1653, BK 9190 und BK 3043 sowie ATCC 29212 und V067230 auf. Im Dendrogramm sind drei Hauptgruppen erkennbar, die erste teilt sich in die beiden Untergruppen mit den Isolaten BK 5187, BK 1653, BK 6747/2 und BK 4997/3 sowie BK 6886/2 und BK 1565. Jedoch weisen die beiden Isolate der zweiten Untergruppe eine recht große Entfernung zueinander auf, sodass BK 1565 zu den Isolaten der anderen Untergruppe eine geringere Entfernung besitzt als zu BK 6886/2. Bei der zweiten Hauptgruppe lassen sich Untergruppen nicht eindeutig festlegen. Diese besteht aus den Isolaten BK 9190, BK 3043, BK 3062, BK 905, BK 5597/2 und BK 848. Dabei ist die Entfernung von BK 848 zu den anderen Isolaten der Gruppe am größten. In der dritten Hauptgruppe liegen die Isolate BK 9367, BK 8653, BK 7183 und BK 6037/2 am engsten beieinander. Die Stämme ATCC 29212, V067230, BK 5363/2 und BK 2164 fallen durch ihre recht große Distanz zu den anderen Isolaten der Hauptgruppe auf.

Beim Primer ERIC1R weisen sowohl bei UPGMA als auch bei NJ dieselben Isolate eine Distanz von null zueinander auf. Dabei handelt es sich um BK 8653 und BK 7183, BK 5187 und BK 165, BK 9190 und BK 3043 sowie V067230 und ATCC 29212. Den Isolaten BK 8653 und BK 7183 lässt sich mit beiden Verfahren Isolat BK 6037/2 mit recht geringer Distanz zuordnen, ebenso folgt als nächstes Isolat BK 9367. Jedoch sind

die Isolate BK 6037/2 und BK 9367 bei NJ weiter voneinander entfernt als bei UPGMA. Bei UPGMA weist das Isolat BK 281 eine geringe Distanz zu BK 9190 und BK 3043 auf, während sich dasselbe Isolat bei NJ in einem anderen Cluster befindet. Die Isolate BK 5187 und BK 1653 weisen zu den Isolaten BK 6747/2, BK 4997/3 und BK 1565 eine geringe Distanz bei NJ auf, dasselbe gilt für UPGMA. Jedoch ist bei UPGMA noch BK 848 in dieser Gruppe enthalten und weist sogar eine geringere Distanz zu BK 5187 und BK 1653 auf als BK 6746/2 und BK 4997/3, bei NJ hingegen wird das Isolat BK 848 einem anderen Cluster zugeordnet.

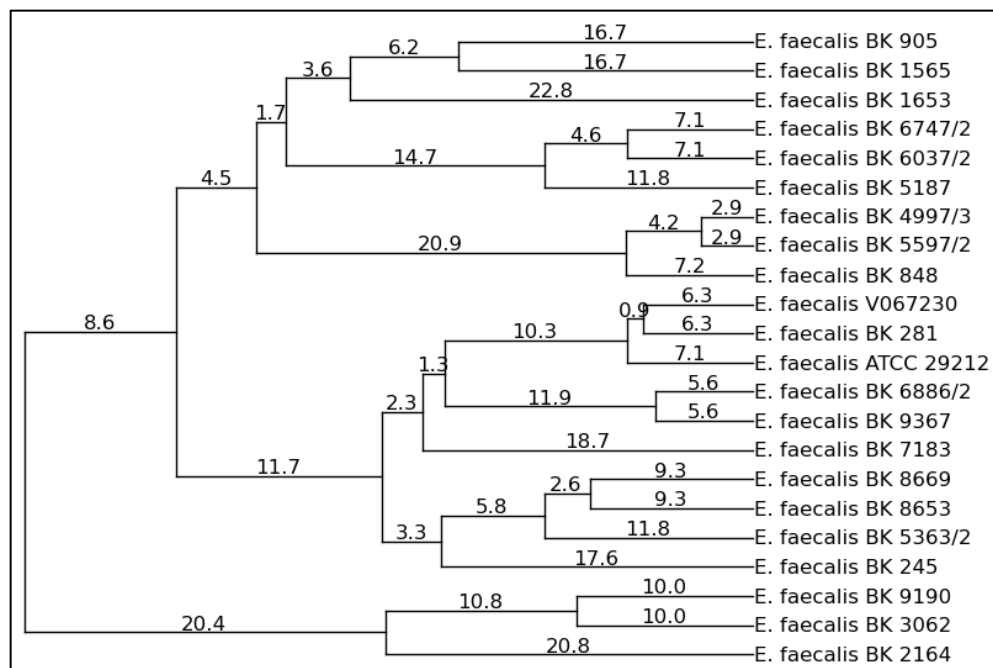


Abbildung 55: Dendrogramm zu *E. faecalis* mit dem Primer CC1, erstellt mittels UPGMA

Im Programm PyElph 1.4 wurde der Threshold auf 6, die Filter width auf 1 und die Filter passes auf 10 eingestellt. Für die Ermittlung der Distanzen wurde die Methode UPGMA angewendet. Bei den Isolaten ist eine Unterteilung in drei Hauptgruppen erkennbar. Die erste besteht aus den Isolaten BK 905, BK 1565, BK 1635, BK 6747/2, BK 6037/2, BK 5187, BK 4997/3, BK 5597/2 und BK 484. Auch die drei zuerst genannten Isolate lassen sich von den drei mittleren Isolaten gut unterscheiden. Dabei sind die drei zuletzt genannten Isolate weiter vom Rest der Gruppe entfernt. In der zweiten Hauptgruppe sind die Isolate BK 281, BK 6886/2, BK 9367, BK 7183, BK 8669, BK 8653, BK 5363/2 und BK 245 sowie der ATCC-Stamm 29212 enthalten. Hier lassen sich auch noch Unterteilungen in Untergruppen treffen, dabei ist die Anzahl der Untergruppen davon abhängig, wie die Entfernungen zwischen den Isolaten gewählt werden. So könnten beispielsweise die Isolate BK 6886/2 und BK 9367 sowohl der gleichen Gruppe wie die

Isolate V067230, BK 281 und ATCC-Stamm 29212 zugeordnet als auch getrennt voneinander betrachtet werden. Die dritte Hauptgruppe beinhaltet die Isolate BK 9190, BK 3062 und BK 2164 und weist die größte Distanz zu den beiden anderen Hauptgruppen auf. In diesem Dendrogramm gibt es keine Isolate, die eine Distanz von null haben.

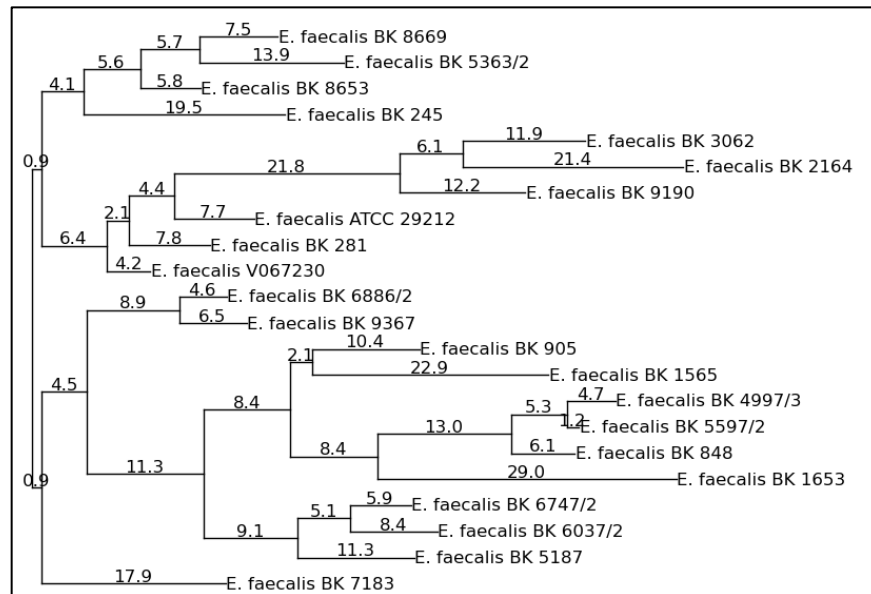


Abbildung 56: Dendrogramm zu *E. faecalis* mit dem Primer CC1, erstellt mittels NJ

Für den Vergleich der Banden wurde im Programm PyElph 1.4 der Threshold auf 6, die Filter width auf 1 und die Filter passes auf 10 gesetzt. Für die Ermittlung der Distanzen wurde die Methode Neighbour Joining angewendet. Zunächst fällt auf, dass in diesem Dendrogramm keine Isolate mit einer Distanz von null vorhanden sind. Es gibt zwei Hauptgruppen, die sich in je zwei Untergruppen teilen. In der ersten Hauptgruppe bilden jeweils die Isolate BK 8669, BK 5363/2, BK 8653 und BK 245 sowie die Isolate BK 3062, BK 2164, BK 9190, BK 281, V067230 und ATCC-Stamm 29212 eine Untergruppe, Dabei sind BK 3062, BK 2164 und BK 9190 deutlich von den anderen Isolaten ihrer Untergruppe distanziert. In der zweiten Hauptgruppe bildet das Isolat BK 7183 eine Untergruppe für sich. Die zweite Untergruppe besteht aus insgesamt vier weiteren Gruppen. Dabei grenzen sich die Isolate BK 6886/2 und BK 9367 deutlich vom Rest ab. Die beiden Gruppen BK 905 und BK 1565 sowie BK 4997/3, BK 5597/2, BK 848 und BK 1653 sind näher beieinander als die Gruppe BK 6747/2, BK 6037/2 und BK 5187. Das Isolat BK 1653 hat dabei eine größere Distanz innerhalb seiner Gruppe zu den anderen Isolaten.

Beim Primer CC1 gibt es weder bei UPGMA noch bei NJ Isolate, die eine Distanz von null aufweisen. Mit geringen Distanzen lassen sich die Isolate BK 6747/2, BK 6037/2 und BK 5187 sowie BK 4997/3, BK 5597/2 und BK 848 sowohl bei UPGMA als auch bei NJ je einer Gruppe zuordnen. Gleiches gilt für die Isolate BK 281, V067230 und

ATCC 29212 sowie BK 8669, BK 8653 und BK 5363/2. Bei all diesen Gruppen ist das an dritter Stelle genannte Isolat am weitesten von den anderen beiden entfernt. Auch BK 6886/2 und BK 9367 sowie BK 9190 und BK 3062 zeichnen sich bei beiden Verfahren durch geringe Distanzen zueinander aus.

Bei der Betrachtung von den beiden Primer ERIC1R und CC1 bei UPGMA fällt auf, dass nur V067230 und ATCC 29212 sowie BK 4997/2 und BK 848 in derselben Gruppe sind, ebenso BK 6747/2 und BK 5187. Bei den restlichen Gruppen gibt es keine Übereinstimmungen.

Bei NJ sind unter Berücksichtigung der beiden Primer nur Übereinstimmungen bei V067230 und ATCC 29212 sowie BK 6747/2 und BK 5187 zu finden. Alle anderen Gruppen weisen nicht dieselben Isolate mit geringer Distanz auf.

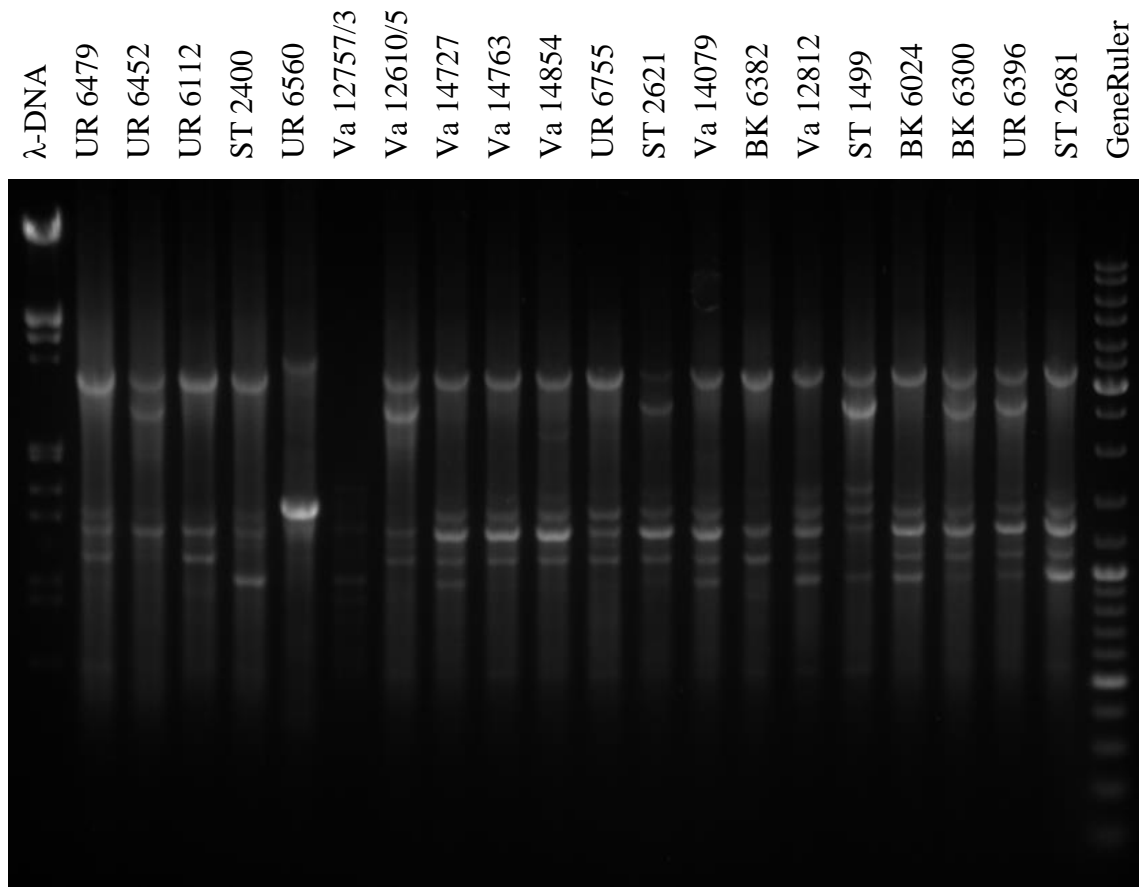
E. faecium

Abbildung 57: RAPD-PCR für 20 *E. faecium*-Isolate mit dem Primer M13R2

Auf der Abbildung sind die RAPD-Banden von 20 *E. faecium*-Isolaten, welche mit dem Primer M13R2 amplifiziert wurden, erkennbar. Dabei zeigt das Isolat Va 12757/3 eine starke Abweichung von den anderen Isolaten. Es wurden dieselben Marker λ -DNA und GeneRuler eingesetzt wie bei den Gelen mit *E. faecalis*.

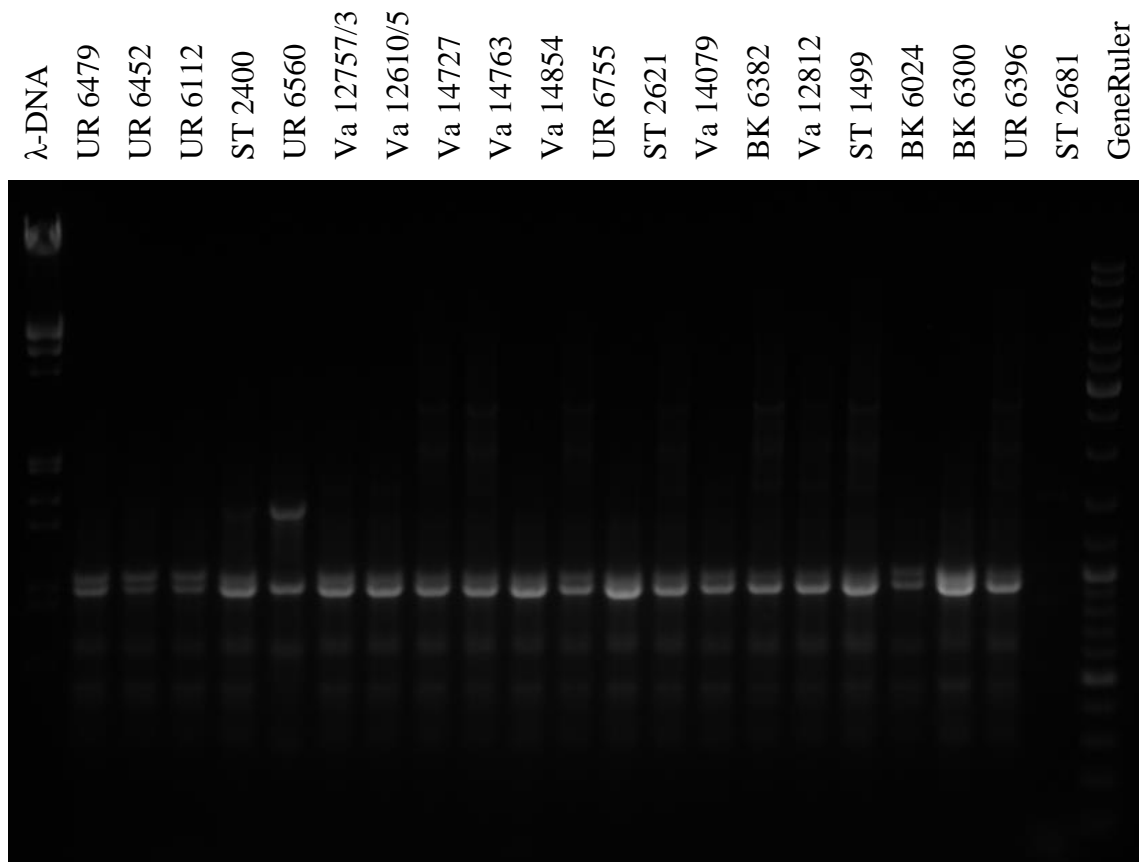


Abbildung 58: RAPD-PCR für 20 *E. faecium*-Isolate mit den Primern AP4 und ERIC1R

Auf dieser Abbildung sind die RAPD-Banden von 20 *E. faecium*-Isolaten erkennbar. Diese wurden mit Hilfe der Primer-Kombination AP4 und ERIC1R amplifiziert. Für das Isolat ST 2681 sind nur sehr schwache Banden erkennbar. Es wurden dieselben Marker eingesetzt wie bei den Gelen mit *E. faecalis*.

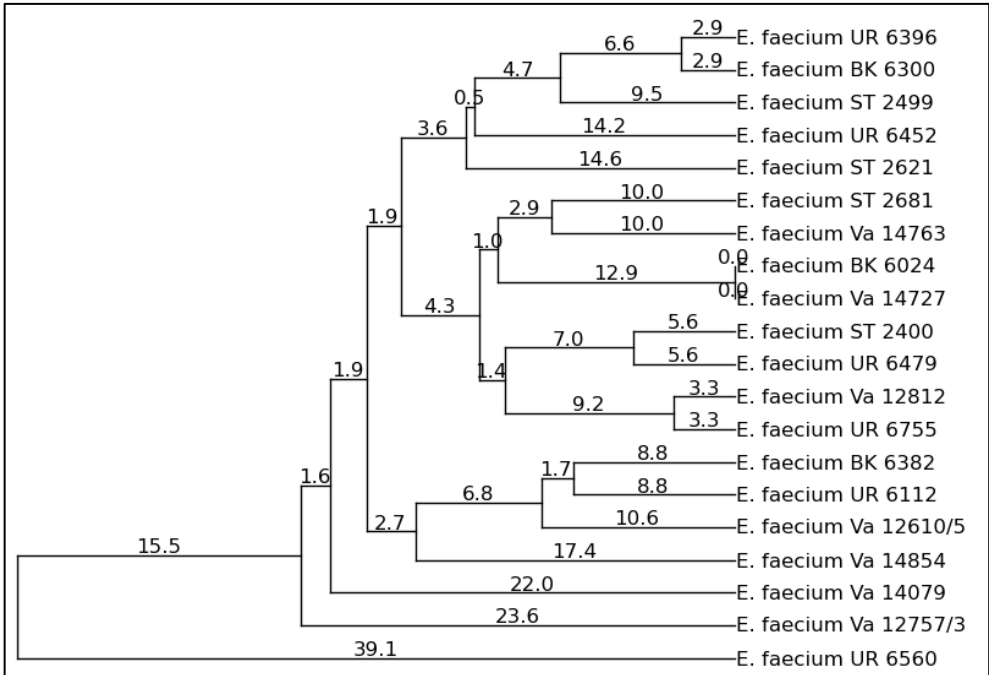


Abbildung 59: Dendrogramm zu *E. faecium* mit dem Primer M13R2, erstellt mittels UPGMA

Für den Vergleich der Banden wurde bei der Software PyElph 1.4 der Threshold auf 7, die Filter width auf 1 und die Filter passes auf 10 eingestellt. Für die Ermittlung der Distanzen wurde die Methode UPGMA angewendet. Das Isolat UR 6560 ist am weitesten von den anderen Isolaten entfernt. Zwischen den Isolaten BK 6024 und Va 14727 konnte keine Distanz ermittelt werden. Diese beiden Isolate bilden mit den Isolaten ST 2681 und Va 14763 eine Gruppe. Die Isolate Va 12812 und UR 6755 sowie die Isolate ST 2400 und UR 6479 weisen eine geringe Entfernung zueinander auf und lassen sich außerdem einer gemeinsamen Gruppe zuordnen. Diese beiden Gruppen können zu einer größeren Gruppe verbunden werden. Die Isolate UR 6396, BK 6300 und ST 2499 liegen sehr eng beieinander. Dieser Gruppe lassen sich mit etwas größerer Entfernung die Isolate UR 6452 und ST 2621 zuordnen. Eine weitere Gruppe bilden die Isolate BK 6382, UR 6112 und Va 12610/5.

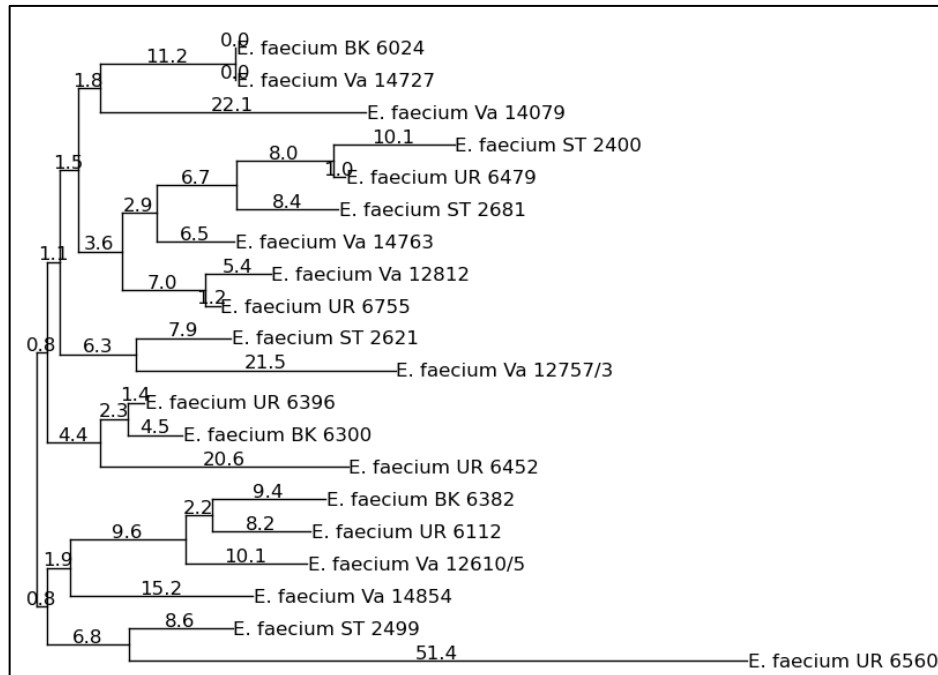


Abbildung 60: Dendrogramm zu *E. faecium* mit dem Primer M13R2, erstellt mittels NJ

Im Programm PyElph 1.4 wurde für den Vergleich der Banden ein Threshold von 7, die Filter width auf 1 und die Filter passes auf 10 eingestellt. Für die Ermittlung der Distanzen wurde die Methode Neighbour Joining angewendet. Dabei fällt auf, dass das Isolat UR 6560 am weitesten von den anderen Isolaten entfernt ist. Zwischen den Isolaten BK 6024 und Va 14727 war mithilfe der eingestellten Parameter keine Distanz erkennbar. Geringe Distanzen zueinander wiesen sowohl die Isolate UR 6479 und ST 2681 als auch die Isolate Va 14763, Va 12812 und UR 6755 auf. Diese beiden Gruppen lassen sich einer gemeinsamen Gruppe zuordnen. Die Isolate UR 6396 und BK 6300 weisen eine geringe Distanz zueinander auf. Außerdem wurde eine geringe Distanz zwischen den Isolaten BK 6382, UR 6112 und Va 12610/5 festgestellt.

Sowohl bei UPGMA als auch bei NJ weisen die beiden Isolate BK 6024 und Va 14727 mit dem Primer M13R2 eine Distanz von null zueinander auf. Bei beiden Verfahren weisen UR 6112, BK 6382 und Va 12610/5 eine geringe Distanz zueinander auf, wobei das zuletzt genannte Isolat am weitesten von den anderen Isolaten entfernt ist. Bei UPGMA bilden UR 6396 und BK 6300 mit ST 2499 eine Gruppe, während bei NJ das Isolat ST 2499 von den anderen beiden Isolaten weit entfernt ist. Bei UPGMA und NJ weisen die Isolate Va 12812 und UR 6755 eine geringe Distanz zueinander auf, jedoch werden dieser Gruppe bei UPGMA die Isolate ST 2400 und UR 6479 zugeordnet, bei NJ hingegen gehört Isolat Va 14763 der Gruppe an. Bei UPGMA weist ST 2681 eine geringe Entfernung zu Va 14763 auf, während dasselbe Isolat bei NJ eine geringe Distanz zu UR 6479 aufweist. Wenn eine größere Distanz zwischen den Isolaten betrachtet wird, sind

bei UPGMA die Isolate ST 2681, Va 14763, BK 6024, Va 14727, ST 2400, UR 6479, Va 12812 und UR 6755 in einem größeren Cluster. Ein ähnliches Cluster ist auch bei NJ vorhanden, darin sind allerdings die Isolate BK 6024 und Va 14727 nicht enthalten.

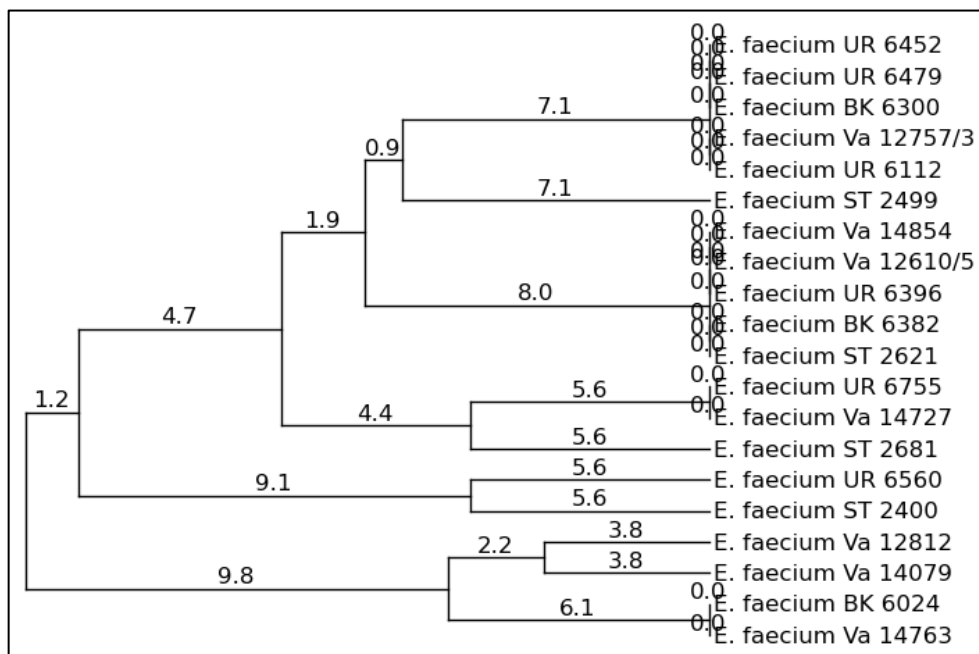


Abbildung 61: Dendrogramm für *E. faecium* mit den Primern AP4 und ERIC1R, erstellt mittels UPGMA

Für die Erstellung des in Abbildung 34 gezeigten Dendrogrammes wurde das Programm PyElph 1.4 verwendet. Für den Vergleich der Banden wurde der Threshold auf 10, die Filter width auf 2 und die Filter passes auf 10 eingestellt. Für die Ermittlung der Distanzen wurde die Methode UPGMA ausgeführt. Die Isolate UR 6452, UR 6479, BK 6300, Va 12757/3 und UR 6112 ließen sich mit den angewendeten Filtern nicht unterscheiden. Zwischen den Islaten Va 14854, Va 12610/5, UR 6396, BK 6382 und ST 2621 konnte ebenfalls keine Entfernung ermittelt werden. Diese beiden Gruppen lassen sich gemeinsam mit Isolat ST 2499 einer größeren Gruppe zuordnen. Außerdem betrug die Distanz zwischen den Isolaten UR 6755 und Va 14727 null. Diese Isolate weisen eine geringe Distanz zu Isolat St 2681 auf. Bei den Isolaten BK 6024 und Va 14763 betrug die Distanz null. Eine geringe Distanz wurde für die Isolate Va 12812 und Va 14079 festgestellt. Außerdem lassen sich die beiden Isolate einer Gruppe mit den zuvor beschriebenen Isolaten BK 6024 und Va 14763 zuordnen. Des Weiteren weisen die Isolate UR 6560 und St 2400 eine geringe Entfernung voneinander auf.

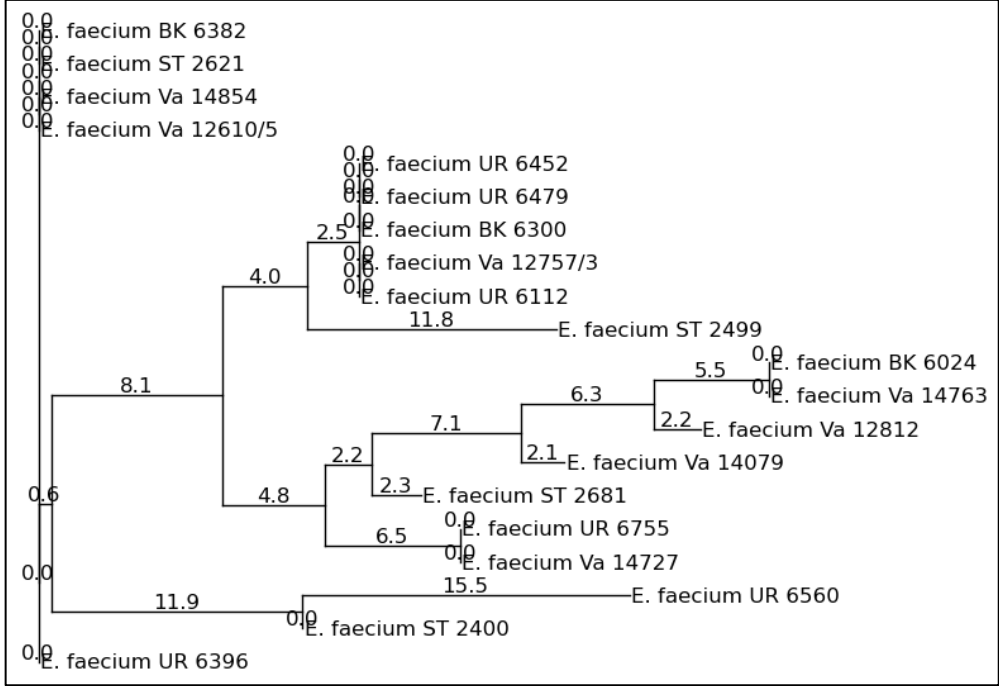


Abbildung 62: Dendrogramm für *E. faecium* mit den Primern AP4 und ERIC1R, erstellt mittels NJ

Für den Vergleich der Banden wurde das Dendrogramm mit PyElph 1.4 erstellt und folgende Parameter verwendet: ein Threshold von 10, die Filter width auf 2 und die Filter passes auf 10. Für die Ermittlung der Distanzen wurde die Methode Neighbour Joining verwendet. Eine Distanz von null wurde jeweils sowohl für die Isolate BK 6382, ST 2621, Va 14854, Va 12610/5 und UR 6396 als auch für die Isolate UR 6452, UR 6479, BK 6300, Va 12757/3 und UR 6112 bestimmt. Letztere können mit dem Isolat 2499 in einer Gruppe eingeordnet werden, da hier nur eine geringe Entfernung zueinander besteht. Ebenso konnte für die Isolate BK 6024 und Va 14763 sowie UR 6755 und Va 14727 keine Entfernung ermittelt werden. Die Isolate Va12812 und Va 14079 lassen sich den Isolaten BK 6024 und Va 14763 aufgrund geringer Entfernung zuordnen. Das Isolat ST 2681 kann sowohl mit UR 6755 und Va 14727 als auch mit Va 14079 eine Gruppe bilden. Durch diese nicht eindeutige Zuordnung sind alle genannten Isolate in einer gemeinsamen Gruppe vereint.

Sowohl bei UPGMA als auch bei NJ wurde für die Primerkombination AP4 und ERIC1R keine Distanz zwischen UR 6452, UR 6479, BK 6300, Va 12575/3 und UR 6112 ermittelt. Der Gruppe wird bei beiden Verfahren ST 2499 mit geringer Distanz zu den anderen Isolaten zugeordnet. Die Isolate UR 6569 und ST 2400 weisen sowohl bei UPGMA als auch bei NJ eine geringe Distanz zueinander auf. Zwischen den Isolaten Va 14854, Va 12610/5, UR 6369, BK 6382 und ST 2621 wurde mittels NJ eine Distanz von null ermittelt. Dieselben Isolate weisen auch bei UPGMA keine Distanz zueinander auf.

Jedoch weisen UR 6755 und Va 14727 keine und ST 2681 eine geringe Distanz bei UPGMA zu den genannten Isolaten auf. Bei NJ sind diese drei Isolate in einem anderen Cluster und weisen zu Va 14079 eine geringe Distanz auf. Va 14079 weist jedoch auch zu BK 6024 und Va 14763, welche keine nachweisbare Entfernung zueinander besitzen, sowie Va 12812 eine geringe Entfernung bei NJ auf. Diese vier Isolate bilden auch bei UPGMA eine Gruppe geringer Distanzen, in der BK 6024 und Va 14763 ebenfalls keine Entfernung zueinander nachgewiesen werden kann.

Beim Vergleich der UPGMA-Dendrogramme von M13R2 und der Primerkombination AP4 und ERIC1R fällt auf, dass es keine Isolate gibt, die bei beiden PCR-Läufen eine Distanz von null aufweisen. Die Isolate Va 12610/5 und BK 6382 sowie BK 6024 und Va 14763 weisen zwar bei AP4 und ERIC1R keine Distanz auf, sind bei M13R2 jedoch durch eine geringe Distanz unterscheidbar. Sowohl bei M13R2 als auch bei AP4 und ERIC1R sind BK 6300 und ST 2499 sowie Va 14727 und ST 2681 nur durch eine geringe Distanz voneinander entfernt. Es gibt bei UPGMA keine weiteren Übereinstimmungen bzw. Ähnlichkeiten zwischen den beiden PCR-Läufen.

Bei NJ weisen BK 6382 und Va 12610/5 eine Distanz von null bei AP4 und ERIC1R sowie eine geringe Entfernung bei M13R2 auf. Außerdem weisen Va 14763 und Va 12812 eine geringe Entfernung bei beiden PCR-Läufen auf. Va 12812 und UR 6755 sind bei M13R2 zwar weiter voneinander distanziert als bei AP4 und ERIC1R, weisen jedoch trotzdem noch eine recht geringe Entfernung zueinander auf.

6 Diskussion

MHK und MBIK

MHK-Werte stimmen für die Enterokokken bei Thioridazin mit den Literaturwerten überein [Rahbar et al., 2010; Hendricks et al., 2005]. Allerdings verschiebt sich durch die Literaturwerte das Verhältnis der MHK-Werte. Bei *S. aureus* gibt es in der Literatur große Abweichungen für Reserpin und Thioridazin, jedoch wurden die MHK-Werte aus der aufgefundenen Literatur zum Teil mit anderen Methoden ermittelt [Martins et al., 2004, Kristiansen et al., 2003; Hendricks et al., 2003]. Daher stellt sich die Frage, inwiefern die Werte vergleichbar sind. Außerdem ist bei *S. aureus* auffällig, dass Reserpin in der aufgefundenen Literaturquelle für alle dort getesteten Isolate eine deutlich höhere MHK aufweist als sich in den durchgeführten Experimenten ergeben hat und die MHK bei Thioridazin deutlich niedriger ausfällt. [Kaatz et al., 2003; Kristiansen et al., 2003; Hendricks et al., 2003; Martins et al., 2004] Dies könnte dadurch begründet sein, dass eventuell unterschiedliche Lösemittel für die EPI's verwendet wurden und diese möglicherweise deren Wirkspektrum in Bezug auf die antimikrobiellen Eigenschaften beeinflussen oder die EPI's mit dem verwendeten Medium interagieren. Außerdem könnten die Isolate von *S. aureus* durch Mutationen sehr voneinander abweichen, was ebenfalls zu unterschiedlichen MHK-Werten führen könnte.

Die Auswahl der Isolate für die MBIK-Bestimmung erfolgte lediglich nach den zuvor bestimmten MHK-Werten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die MHK-Werte, welche zu einem großen Teil vorkamen, durch je mindestens ein Isolat von *E. faecalis*, *E. faecium* oder *S. aureus* vertreten waren. Dabei wurde nicht berücksichtigt, ob es sich bei den Isolaten um VRE oder VSE bzw. MRSA oder MSSA handelt.

Die Bestimmung der MBIK erfolgte nur unvollständig, da lediglich die höchstmögliche Konzentration der EPI's eingesetzt wurde, die bei Menschen einsetzbar wäre. Da hier bei einem großen Teil der Isolate keine Hemmung sichtbar war, ist eine höhere Dosierung aufgrund der Einsetzbarkeit der EPI's nicht sinnvoll. Bei Thioridazin und teilweise bei Sertralin konnte eine Wirkung festgestellt werden, diese muss jedoch nicht der MBIK entsprechen. Da keine niedrigeren Konzentrationen getestet wurden, ist hier keine Vergleichsmöglichkeit vorhanden.

In einer Studie [Chu et al., 2016] wurde gezeigt, wie sich verschiedene Konzentrationen von Berberin auf MRSA-Biofilme auswirken. Dabei wurden eine unbehandelte Kontrolle sowie Berberin in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Abbildung 3 f der Studie weist dabei ein ähnliches Aussehen wie die Isolate, die durch Thioridazin und Sertralin am Wachstum gehindert wurden, auf. Bei einer weiteren Studie [Ran et al., 2015] wurde *E. faecalis* in normalem TSB und in einem TSB-Medium, bei dem der pH-Wert auf 10 eingestellt wurde, inkubiert. Hier ist der Effekt der pH-Änderung deutlich sichtbar in Abbildung 1 aus der Studie. Beim Vergleich von dem Ergebnis der Studie mit den wirksamen EPI's fällt jedoch auf, dass die Wirkung von erhöhten pH-Werten geringer ist als die der EPI's.

Die minimale Biofilm-eradizierende Konzentration (MBEK) ist die Konzentration, die benötigt wird, um einen vorhandenen Biofilm zu eliminieren. Diese kann um ein Vielfaches höher sein als die MHK. Zur Bestimmung der MBEK werden die Bakterien 48 Stunden inkubiert, dabei erfolgt wie bei der MBIK nach 24 Stunden ein Wechsel des Mediums. Im Gegensatz zur MBIK wird der EPI jedoch erst nach 24 Stunden hinzugegeben. Wenn die 48 Stunden um sind, erfolgt das Vorgehen analog zur MBIK-Bestimmung. Durch die Zugabe der EPI's zu einem späteren Zeitpunkt als bei der MBIK sind um ein Vielfaches höhere Resistenzen zu erwarten. Da bei den verwendeten EPI-Konzentrationen bei der MBIK schon teilweise Resistenzen auftraten, ist die Bestimmung der MBEK nicht sinnvoll.

RAPD-PCR und Dendrogramme

Die RAPD-PCR ist abhängig von der Qualität der isolierten DNA. Die DNA kann durch RNA, Proteine oder Rückstände aus dem Isolationsverfahren beeinträchtigt sein. Diese Verunreinigungen können dazu führen, dass die DNA-Konzentration der Probe falsch ermittelt und damit die falsche Menge zum Mastermix hinzugegeben wird. Um möglichst geringe Verunreinigungen aus der Probe in den PCR-Ansatz zu überführen, wird der Quotient aus A260 und A280 bei der Messung der DNA-Konzentration ermittelt. Historisch gesehen, wird ein Quotient von 1,8 für DNA und 2,0 für RNA als reine Nukleinsäure angesehen. [Wilfinger et al., 1997] Es wurde jedoch herausgefunden, dass pH-Wert und Ionenstärke sowohl diesen Quotienten als auch die Bestimmung der Konzentration beeinflussen. [Wilfinger et al., 1997] Daher wurden für die RAPD-PCR Proben mit einem Quotienten von einer Abweichung von $\pm 0,2$ zugelassen, dies entspricht

einem Bereich von 1,6 bis 2,0. Wären die Werte unterhalb des definierten Bereichs, müsste von Verunreinigungen durch Proteine ausgegangen werden. [Wilfinger et al., 1997] In den Proben enthaltene Proteine wurden mit Proteinkinase K verdaut. RNA hingegen wurde nicht enzymatisch abgebaut, da diese laut Angaben im Kit die PCR nicht beeinflusst.

Die Auswahl der Primer für die Etablierung erfolgte anhand vorangegangener Experimente anderer Labore [Martin et al., 2005; Martin et al., 2009; Banerjee, 2013; Barbier et al., 1996; Pereira et al., 2002; Idil & Bilkay, 2014]. Der Mastermix wurde so angepasst, dass die Komponenten bis auf die Primer gleich sind, um eine Vergleichbarkeit der Bedingungen herzustellen. Bei den PCR-Läufen wurden die Temperaturen für die Primer wie beschrieben eingestellt. Dies muss jedoch nicht den optimalen Bedingungen für eine RAPD-PCR entsprechen, da es hier zu Abweichungen bei den Mastermixen kam, die in der Literatur für die unterschiedlichen Primer angegeben wurden [Martin et al., 2005; Martin et al., 2009; Banerjee, 2013; Barbier et al., 1996; Pereira et al., 2002; Idil & Bilkay, 2014]. Diese Abweichungen vom Mastermix könnten die Ergebnisse beeinflusst haben, sodass sich in der Arbeit nicht dieselbe Qualität der Ergebnisse erzielen lies. Daher wurden im zweiten Schritt die Primer ausgewählt, die unter den gewählten Bedingungen eine gute Diskriminierung ermöglichten.

Die Gelelektrophorese lieferte bei 60 Volt eine sehr gute Auftrennung der RAPD-Banden. Dies bedeutete jedoch eine lange Laufzeit im Gel, welche für Routine-Untersuchungen in großer Stückzahl problematisch werden könnte. Je besser die Auftrennung ist, desto besser lässt sich der Vergleich der einzelnen Banden umsetzen. Bei schlecht aufgetrennten Banden können falsche Positivaussagen in Bezug auf die Klonalität getroffen werden, da Banden, die eigentlich unterschiedlich ist, in diesem Fall nicht zu unterscheiden wären.

Die Auswertung der RAPD-PCR in Bezug auf die Klonalität erfolgte durch den Vergleich von jeweils zwei Dendrogrammen pro Spezies. Für *S. aureus* konnte mithilfe der Primer-Etablierung nur ein möglicher Primer gefunden werden, bei dem die Kontrolle mit destilliertem Wasser negativ war. Unter diesen Bedingungen war ein Vergleich von zwei Primern von Anfang an nicht möglich, daher wurde die RAPD-PCR für die 22 *S. aureus*-Isolate auch nicht mit einem Primer durchgeführt.

Bei den Dendrogrammen gibt es Abweichungen zwischen den Verfahren UPGMA und NJ. Bei UPGMA und NJ handelt es sich um Distanz-basierte Methoden, die beide verwendet werden, um einen einzigen phylogenetischen Baum zu erstellen. Obwohl beide Methoden einen einzigen Baum konstruieren, muss dieser bei der gleichen Datengrundlage nicht mit dem jeweils anderen Baum übereinstimmen [Backeljau et al., 1996]. Dies lässt sich mit der Funktionsweise der beiden Verfahren erklären.

Das allgemeine Vorgehen bei der Erstellung einer Distanzmatrix sieht dabei wie folgt aus: Zuerst wird für jedes Element der Matrix ein eigenes Cluster definiert. Dann werden die beiden Cluster mit der geringsten Distanz bestimmt und zu einem neuen Cluster zusammengefasst. Anschließend wird die Distanz zwischen dem neuen Cluster und allen anderen Clustern bestimmt. Dabei bilden immer die Cluster mit der geringsten Distanz ein neues Cluster, solange bis alle Entfernungen ermittelt wurden [Gronau & Moran, 2007].

UPGMA ist der für gewöhnlich am häufigsten genutzte Algorithmus und definiert die Entfernung zwischen zwei Clustern als ihre durchschnittliche Entfernung. Nachdem die beiden Elemente (C_i, C_j) mit der geringsten Entfernung zu einem Cluster vereint wurden, erfolgt die Bestimmung aller weiteren Distanzen anhand folgender Formel:

$$D(C_k, (C_i \cup C_j)) \leftarrow \frac{|C_i|}{|C_i| + |C_j|} D(C_k, C_i) + \frac{|C_j|}{|C_i| + |C_j|} D(C_k, C_j)$$

Dabei gilt:

$$C_k \in C \setminus \{C_i \cup C_j\}$$

[Gronau & Moran, 2007]

Bei NJ wird ein einzigartiger phylogenetischer Baum nach dem Prinzip der minimalen Evolution konstruiert. Dabei wird sowohl die Topologie als auch die Länge der Zweige des Baumes erstellt. Ein Paar Nachbarn wird als ein Paar operative, taxonomischen Einheiten (engl. operational taxonomic units, OUT's), welche durch einen Knoten in einem unverwurzelten, verzweigten Baum verbunden sind, definiert. Dabei wird zunächst von einem sternförmigen Baum ausgegangen und dann sukzessive das Clustering vorgenommen [Saitou & Nei, 1987].

Die Distanzen zwischen den Nachbarn werden wie folgt berechnet, dabei wird von einer kombinierten OTU und einer weiteren OUT ausgegangen:

$$D_{(1-2)j} = (D_{1j} + D_{2j})/2$$

[Saitou & Nei, 1987]

Die Länge der Äste lässt sich für die OTU 1 und 2 anhand der nachfolgenden Formeln berechnen:

$$L_{1X} = (D_{12} + D_{1Z} - D_{2Z})/2$$

$$L_{2X} = (D_{12} + D_{2Z} - D_{1Z})/2$$

Dabei steht Z für alle anderen OTU's außer 1 und 2. D_{1Z} und D_{2Z} sind die Entfernungen zwischen 1 und Z bzw. 2 und Z. [Saitou & Nei, 1987]

Des Weiteren kann es zu einer Abhängigkeit von der Eingabe der Daten kommen, wenn die geringsten Distanzen mit mehr als einer OTU in Verbindung gebracht werden [Backeljau et al., 1996; Bayer, 1985]. Dies hat zur Folge, dass mehr als nur ein einziger Baum ausgegeben werden könnte. Viele Computerprogramme selektieren hier oft eine OTU pro Gruppierungszyklus, diese hängt in der Regel mit der Reihenfolge der Daten zusammen [Backeljau et al., 1996]. Die Reihenfolge der Isolate ist für die jeweiligen Primer gleich, trotzdem könnte diese Eigenschaft die Dendrogramme beeinflusst haben. Ein gleicher Baum würde entstehen, wenn beispielsweise Isolat 1 und 2 sowie 5 und 6 bei einem Primer dieselbe Distanz zueinander aufweisen würden und beim zweiten Primer bei Isolat 1 und 2 eine geringere Distanz als bei Isolat 5 und 6 ermittelt werden würde. Aufgrund der Auswahl der zuerst eingegebenen Daten würde bei beiden Primern die Distanz zwischen Isolat 1 und 2 vorrangig angewendet werden. In einem anderen Fall wird davon ausgegangen, dass der erste Primer zu denselben Distanzen führt und beim zweiten Primer stattdessen Isolat 1 und 2 eine höhere Distanz zueinander aufweisen würden als Isolat 5 und 6. In diesem Fall wäre es theoretisch möglich, der Distanz von Isolat 5 und 6 den Vorrang zu geben bei der Konstruktion des Baumes und so gleiche Bäume zu erhalten. Dies würde jedoch aufgrund der Programmierung nicht ausgeführt werden und zu unterschiedlichen Bäumen führen.

Außerdem ist zu beachten, dass mit allen Methoden zur Erstellung von phylogenetischen Bäumen nur eine Einschätzung der Phylogenie erzielt werden kann, da in diesen Methoden die Evolution anhand eines Modells vereinfacht dargestellt und berechnet

wird. Dadurch werden mitunter nicht alle Parameter berücksichtigt, die für einen korrekten phylogenetischen Baum nötig wären. Die Korrektheit des Baumes ist in Abhängigkeit vom Modell zur Evolution jeweils bei UPGMA oder NJ größer, dabei kann jedoch sowohl eine hohe als auch eine vollständige Übereinstimmung mit der realen Evolution erzielt werden. [Hillis et al., 2010]

Bei Vergleich der *E. faecalis*-Isolate anhand der Primer fallen die vielen Unterschiede und die wenigen Gemeinsamkeiten auf. Dies könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass bei ERIC1R bei einem Teil der Stämme nur wenige Banden sichtbar waren. So kam es zu größeren Distanzen zwischen diesen und den restlichen Stämmen. Wären mehr Banden zu sehen, würde sich höchstwahrscheinlich eine andere Topologie für den phylogenetischen Baum ergeben. Jedoch stellt sich die Frage, ob die Sichtbarkeit der Banden an der Qualität des Gels lag oder der Primer bei diesen Stämmen lediglich eine geringere Anzahl an Banden aufgrund fehlender Bindestellen generieren konnte. Des Weiteren konnte bei CC1 das Isolat BK 3043 nicht mit einbezogen werden, weil die RAPD-Banden dieses Isolates fehlen. Auch die benachbarten Isolate aus dem Gel, BK 2164 und BK 3062 wiesen schwächere Banden auf, was dazu geführt haben konnte, dass diese nicht vollständig detektiert wurden. Beim Vergleich der *E. faecium*-Isolate fielen zwar mehr Gemeinsamkeiten auf als bei den *E. faecalis*-Isolaten, jedoch waren weiterhin viele Unterschiede deutlich sichtbar. Dies kann damit zu tun haben, dass die RAPD-PCR auf kurzen Primern basiert, die zufällige Abschnitte des Genoms vervielfältigen [Kumar & Gurusubramanian, 2011]. Diese Abschnitte können mehr oder weniger konserviert sein, d. h. der eine Primer findet mehr Gemeinsamkeiten zwischen den Isolaten als ein anderer. Daher sind Abweichungen der Ergebnisse mit verschiedenen Primern generell zu erwarten. So ist bei Isolaten mit geringer Entfernung bei allen verwendeten Primer von einer Klonalität auszugehen. Jedoch ist auch bei Isolaten, die nur bei einem Primer ähnlich sind, eine gewisse Klonalität wahrscheinlich, auch wenn sich diese nicht mit beiden Primer nachweisen lässt.

Außerdem ist die Qualität der Dendrogramme von der Qualität des Gelbildes und der entsprechenden Anpassung der Parameter abhängig. Bei schwachen Bandenmustern, müssen die Parameter zur Detektion in PyElph angepasst werden, da diese Banden sonst nicht mit einbezogen werden. Dabei können aber auch falsch positive Werte entstehen, wo keine Banden vorhanden sind. [Pavel & Vasile, 2012]

Die Verwendung von PyElph 1.4 beruht darauf, dass es sich bei der Software um ein frei zugängliches Programm handelt. Außerdem ist das Programm durch seinen Aufbau mit der graphischen Benutzeroberfläche recht einfach zu bedienen. Neben dem Algorithmus zum Bandenvergleich ist bei PyElph auch eine Berechnung und Visualisierung des phylogenetischen Baumes möglich, die beiden Komponenten sind in einem Programm verbunden. Durch die verschiedenen Parameter sind manuelle Anpassungen möglich. PyElph ist unabhängig von dem Gerät, mit dem das Bild aufgenommen wird, d. h. die Auswertung ist nicht an das Aufnahmesystem gebunden. [Pavel & Vasile, 2012]

7 Ausblick

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Tests, d. h. MHK, RAPD-PCR und MBIK, könnten mit gramnegativen Bakterien wie *E. coli* und Vertretern der Gattung *Pseudomonas* durchgeführt werden.

Außerdem ist es denkbar, andere Isolate der verwendeten Spezies auf die MHK zu untersuchen, um eine größere statistische Relevanz der Ergebnisse zu erhalten. Die Größenordnung für diese Untersuchungen sollte mindestens 100 Isolate pro Spezies betragen.

Während bei einigen auf die MBIK getesteten Isolaten kein Effekt sichtbar war, ließen sich bei anderen Isolaten deutliche Effekte erkennen. Bisher wurde nur die höchstmögliche Konzentration, die beim Menschen einsetzbar wäre, für die MBIK verwendet. Bei den Testungen, bei denen Effekte sichtbar waren, könnte eine Wiederholung mit niedrigeren Konzentrationen erfolgen, um zu überprüfen, ob diese auch bei geringeren Konzentrationen auftreten. Des Weiteren könnte bei den mikroskopischen Untersuchungen speziell nach VRE und VSE bzw. MRSA und MSSA unterschieden werden.

Außerdem wäre interessant, wie sich die Zugabe von Antibiotika auf die MBIK auswirkt. So konnte beispielsweise eine verbesserte Wirkung von Vancomycin auf VRE festgestellt werden, wenn diese mit Phenothiazinen, zu denen auch Thioridazin gehört, kombiniert werden. Dies resultierte in deutlich geringen MHK-Werten als die Arzneimittel im Einzeltest aufwiesen, wurde jedoch nicht an Biofilmen getestet [Rahbar et al., 2010; Thanacoody, 2007]. Auch bei *S. aureus* konnten synergetische Effekte bei der Kombination von EPI's mit Antibiotika gemessen werden, jedoch ebenfalls an planktonischen Zellen und nicht an Biofilmen. [Kaatz et al., 2003; Abreu et al., 2014]

Die Etablierung RAPD-PCR sollte bei *S. aureus* für mehrere Primer erfolgen, da bisher nur ein möglicher Primer ermittelt werden konnte. Mit dem Primer P798 sollte außerdem die noch ausstehende RAPD-PCR für die 22 bisher untersuchten Stämme durchgeführt werden.

Außerdem könnte die Auswertung der Gelbilder über ein anderes Programm erfolgen. Eine Methode ist die Erstellung der Distanzmatrix durch den Shannon-Index und die Eingabe der Matrix in das Programm POPGENE, da dieses kein direktes Einlesen der

Gelbilder ermöglicht [Saeglitz, 2004]. Eine weitere Möglichkeit zur Analyse bietet die Software NTSYS-pc, bei der ebenfalls der Dice-Koeffizient zur Erstellung der Distanzmatrix verwendet werden kann. [Idil & Bilkay, 2014] Dieselbe Software kann aber auch anhand von Simpsons Index der Diversitätsberechnung ein Dendrogramm erstellen. [Banerjee, 2013]

Ein weiteres Programm zur Auswertung von Gelbildern ist GelClust. Dieses Programm wies im Test eine höhere Korrektheit bei der Detektion von Spalten und Banden auf als PyElph. Die Anzahl der möglichen Eingabeformate erwies sich als gleich. Allerdings ließen sich mit PyElph eine höhere Anzahl an Cluster-Methoden und Ähnlichkeitskoeffizienten anwenden. [Khakabimamaghani et al., 2013]

8 Zusammenfassung

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) erfolgte im Titerplattenformat nach den Vorschriften des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2003]. Zunächst wurde bei *S. aureus* und *S. epidermidis* die MHK für die Antibiotika bestimmt. Dabei ergab sich für *S. aureus* ATCC 29213 bei Ciprofloxacin und Flucloxacillin jeweils eine MHK von 0,25 mg/l, bei Cefazolin eine MHK von 0,5 mg/l und bei Clindamycin und Rifampicin jeweils eine MHK von kleiner als 0,0625 mg/l. Bei *S. aureus* BK 12963 hingegen ergab sich für diese Antibiotika jeweils eine MHK von größer als 64 mg/l, während bei dem *S. epidermidis*-Isolat Pp 62 a nur bei Clindamycin und Flucloxacillin eine MHK herauskam, die größer als 64 mg/l war. Für Ciprofloxacin und Rifampicin wurden für Pp 62 a eine MHK von kleiner als 0,0625 mg/l ermittelt und bei Cefazolin wurde eine MHK von 8 mg/l bestimmt. Bei Vancomycin stimmte die MHK bei allen drei Isolaten überein und betrug 1 mg/l. Die ermittelten MHK-Werte für *S. aureus* ATCC29213 stimmen mit denen aus den EUCAST-Tabellen überein. [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2016]

Die MHK-Bestimmung für die Effluxpumpen-Inhibitoren (EPI's) erfolgte mit denselben Stämmen analog zu den Antibiotika. Dabei wurden bei den 20 *E. faecium*-Isolaten MHK-Werte von größer als 512 mg/l bei Probenecid, 8-16 mg/l bei Reserpin, 8-16 mg/l bei Sertralin und 16-32 mg/l bei Thioridazin ermittelt. Diese Werte stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein [Hendricks et al., 2005; Rahbar et al., 2010]. Bei den 23 *E. faecalis*-Isolaten wurden MHK-Werte von größer als 512 mg/l bei Probenecid, 8-16 mg/l bei Reserpin, 16-32 mg/l bei Sertralin und 16-32 mg/l bei Thioridazin bestimmt. In der Literatur finden sich übereinstimmende MHK-Werte. [Hendricks et al., 2005; Rahbar et al., 2010] Bei den 22 *S. aureus*-Isolaten ergaben die Testungen MHK-Werte von größer als 512 mg/l bei Probenecid, 8 mg/l bei Reserpin, 8-16 mg/l bei Sertralin und 8-32 mg/l bei Thioridazin. Jedoch stimmen diese Werte nicht mit denen überein, die in der Literatur dazu angegeben werden. [Kristiansen et al., 2003; Kaatz et al., 2003; Hendricks et al., 2003; Martins et al. 2004]

Bei allen Isolaten wurde bei der Behandlung mit Thioridazin ein eingeschränktes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Für *E. faecium* konnte außerdem nach

der Behandlung mit Sertralin ein eingeschränktes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle bei beiden Isolaten festgestellt werden. Für *S. aureus* war bei Isolat Va 32261 nach Zugabe von Sertralin ein eingeschränktes Wachstum sichtbar.

Die RADP-PCR wurde für die *E. faecalis*-Isolate mit den Primern ERIC1R und CC1 durchgeführt und mit dem Programm PyElph 1.4 analysiert. Dabei wurden die Methoden Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) und Neighbor Joining (NJ) zur Erstellung von Dendrogrammen angewandt.

Bei UPGMA fällt für *E. faecalis* auf, dass nur V067230 und ATCC 29212 sowie BK 4997/2 und BK 848 in derselben Gruppe sind, ebenso BK 6747/2 und BK 5187. Bei den restlichen Gruppen gibt es keine Übereinstimmungen. Bei NJ sind nur Übereinstimmungen bei V067230 und ATCC 29212 sowie BK 6747/2 und BK 5187 zu finden. Alle anderen Gruppen weisen nicht dieselben Isolate mit geringer Distanz für beide Primer auf. Insgesamt ist bei beiden Primern sowohl mit NJ als auch mit UPGMA festzustellen, dass ATCC-Stamm 29212 und Isolat V067230 sowie die Isolate BK 6747/2 und BK 5187 wahrscheinlich eine geringe evolutionäre Distanz zueinander aufweisen. Bei ATCC-Stamm 29212 und Isolat V067230 sind jedoch nur wenige Banden mit dem Primer ERIC1R sichtbar, dies könnte eine Fehlinterpretation der Ähnlichkeit nach sich ziehen.

Beim Primer ERIC1R weisen sowohl bei UPGMA als auch bei NJ die *E. faecalis*-Isolate BK 8653 und BK 7183, BK 5187 und BK 165, BK 9190 und BK 3043 sowie V067230 und ATCC 29212 eine Distanz von null zueinander auf. Den Isolaten BK 8653 und BK 7183 lassen sich mit beiden Verfahren die Isolate BK 6037/2 und BK 9367 mit recht geringer Distanz zuordnen. Bei UPGMA weist das Isolat BK 281 eine geringe Distanz zu BK 9190 und BK 3043 auf, während sich dasselbe Isolat bei NJ in einem anderen Cluster befindet. Die Isolate BK 5187 und BK 1653 weisen sowohl bei NJ als auch bei UPGMA eine geringe Distanz zu den Isolaten BK 6747/2, BK 4997/3 und BK 1565 auf. Jedoch ist bei UPGMA noch BK 848 in dieser Gruppe enthalten, bei NJ hingegen wird das Isolat BK 848 einem anderen Cluster zugeordnet.

Beim Primer CC1 lassen sich die *E. faecalis*-Isolate BK 6747/2, BK 6037/2 und BK 5187 sowie BK 4997/3, BK 5597/2 und BK 848 sowohl bei UPGMA als auch bei NJ je einer Gruppe mit geringen Distanzen zuordnen. Gleiches gilt für die Isolate BK 281, V067230 und ATCC 29212 sowie BK 8669, BK 8653 und BK 5363/2. Auch BK 6886/2 und BK

9367 sowie BK 9190 und BK 3062 zeichnen sich bei beiden Verfahren durch geringe Distanzen zueinander aus.

Bei den *E. faecium*-Isolaten wurde die RAPD-PCR mit dem Primer M13R2 und der Primerkombination AP4 und ERIC1R durchgeführt. Die Analyse erfolgte wie bei *E. faecalis* mit dem Programm PyElph 1.4 über UPGMA und NJ.

Bei UPGMA sind die *E. faecium*-Isolate Va 12610/5 und BK 6382 sowie BK 6024 und Va 14763 bei allen Primern in je einer Gruppe. Sowohl bei M13R2 als auch bei AP4 und ERIC1R sind BK 6300 und ST 2499 sowie Va 14727 und ST 2681 nur durch eine geringe Distanz voneinander entfernt. Bei NJ sind BK 6382 und Va 12610/5 in einer Gruppe. Außerdem weisen Va 14763 und Va 12812 sowie Va 12812 und UR 6755 eine geringe Entfernung auf.

Sowohl bei UPGMA als auch bei NJ kann mit allen verwendeten Primern eine Klonalität von den *E. faecium*-Isolaten Va 12610/5 und BK 6382 nachgewiesen werden. Bei den anderen genannten Isolaten ist jedoch die Wahrscheinlichkeit hoch, dass auch diese eine gewisse Klonalität aufweisen.

Sowohl bei UPGMA als auch bei NJ weisen die beiden *E. faecium*-Isolate BK 6024 und Va 14727 mit dem Primer M13R2 eine Distanz von null zueinander auf. Bei beiden Verfahren weisen UR 6112, BK 6382 und Va 12610/5 eine geringe Distanz zueinander auf. Bei UPGMA bilden UR 6396 und BK 6300 mit ST 2499 eine Gruppe, während bei NJ das Isolat ST 2499 von den anderen beiden Isolaten weit entfernt ist. Bei UPGMA und NJ weisen die Isolate Va 12812 und UR 6755 eine geringe Distanz zueinander auf, dieser Gruppe werden bei UPGMA die Isolate ST 2400 und UR 6479 zugeordnet, bei NJ hingegen gehört Isolat Va 14763 der Gruppe an. Bei UPGMA weist ST 2681 eine geringe Entfernung zu Va 14763 auf, während dasselbe Isolat bei NJ eine geringe Distanz zu UR 6479 aufweist. Wenn eine größere Distanz zwischen den Isolaten betrachtet wird, sind bei UPGMA die Isolate ST 2681, Va 14763, BK 6024, Va 14727, ST 2400, UR 6479, Va 12812 und UR 6755 in einem größeren Cluster. Ein ähnliches Cluster ist auch bei NJ vorhanden, darin sind allerdings die Isolate BK 6024 und Va 14727 nicht enthalten.

Mit der Primerkombination AP4 und ERIC1R wurden sowohl bei UPGMA als auch bei NJ die *E. faecium*-Isolate UR 6452, UR 6479, BK 6300, Va 12575/3, UR 6112 und ST 2499 einer Gruppe zugeordnet. Die Isolate UR 6569 und ST 2400 weisen sowohl bei UPGMA als auch bei NJ eine geringe Distanz zueinander auf. Zwischen den Isolaten Va

14854, Va 12610/5, UR 6369, BK 6382 und ST 2621 wurde mit NJ und UPGMA je eine Distanz von null ermittelt. Jedoch weisen UR 6755 und Va 14727 keine und ST 2681 eine geringe Distanz bei UPGMA zu den genannten Isolaten auf, bei NJ sind diese in einem anderen Cluster und weisen zu Va 14079 eine geringe Distanz auf. Va 14079 lässt sich zu BK 6024, Va 14763 und Va 12812 mit einer geringen Entfernung bei NJ zuordnen. Diese vier Isolate bilden auch bei UPGMA eine Gruppe geringer Distanzen. Variable und konservierte Bereiche im Genom werden von allen für eine Spezies verwendeten Primern unterschiedlich amplifiziert und führen daher zu Abweichungen in den Dendrogrammen. Dadurch ist bei Isolaten, die nur bei einem Primer ähnlich sind, eine gewisse Klonalität wahrscheinlich, auch wenn sich diese nicht mit beiden Primern nachweisen lässt.

9 Summary

The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) took place in the titer plate format according to the regulations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2003]. First, the MIC for antibiotics was determined for *S. aureus* and *S. epidermidis*. In the case of ciprofloxacin and flucloxacillin, an MIC of 0.25 mg/l and in the case of cefazoline, an MIC of 0.5 mg/l was determined for *S. aureus* ATCC 29213. An MIC of less than 0.0625 mg/l for each clindamycin and rifampicin were obtained for *S. aureus* ATCC 29213. In *S. aureus* BK 12963, on the other hand, an MIC of greater than 64 mg/l was found for all of these antibiotics, whereas for the *S. epidermidis* isolate Pp 62 a an MIC, which was greater than 64 mg/l, was determined only for clindamycin and flucloxacillin. For ciprofloxacin and rifampicin, an MIC of less than 0.0625 mg/l was obtained for this isolate, and an MIC of 8 mg/l was determined for cefazolin. In the case of vancomycin, the MIC was 1 mg/l for all three isolates. The determined MIC values for *S. aureus* ATCC 29213 are consistent with those from the EUCAST tables.

The MIC determination for the efflux pump inhibitors (EPI's) was carried out analogously to the antibiotics with the same strains. In the case of the 20 *E. faecium* isolates, the MIC values were greater than 512 mg/l for probenecid, 8-16 mg/l for reserpine, 8-16 mg/l for sertraline and 16-32 mg/l for thioridazine. These values are consistent with the values given in literature [Hendricks et al., 2005; Rahbar et al., 2010]. For the 23 *E. faecalis* isolates, MIC values of greater than 512 mg/l for probenecid, 8-16 mg/l for reserpine, 16-32 mg/l for sertraline and 16-32 mg/l for thioridazine were determined. Consistent MIC values were found in literature [Hendricks et al., 2005; Rahbar et al., 2010]. For the 22 *S. aureus* isolates, the tests yielded MIC values of greater than 512 mg/l for probenecid, 8 mg/l for reserpine, 8-16 mg/l for sertraline and 8-32 mg/l for thioridazine. However, these values do not agree with those given in literature [Kristiansen et al., 2003; Kaatz et al., 2003; Hendricks et al., 2003; Martins et al., 2004].

In all isolates, thioridazine treatment showed limited growth compared to controls. For *E. faecium*, a limited growth of both isolates compared to the control was also observed after treatment with sertraline. For *S. aureus*, a limited growth was observed in isolate Va 32261 after addition of sertraline.

RADP-PCR with *E. faecalis* isolates was performed with primers ERIC1R and CC1 and then analyzed with the program PyElph 1.4. The methodology used for the creation of dendrograms was the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) and Neighbor Joining (NJ).

In UPGMA it is noticeable that both *E. faecalis* V067230 and ATCC 29212 as well as BK 4997/2 and BK 848 are in the same group when both primers are used, likewise BK 6747/2 and BK 5187. There are no matches for the remaining groups. For NJ, only matches for V067230 and ATCC 29212 as well as BK 6747/2 and BK 5187 can be found. All other groups do not have the same low-distance isolates for both primers. Overall, both primers with NJ and UPGMA show that ATCC strain 29212 and isolate V067230 as well as the isolates BK 6747/2 and BK 5187 are likely to have a small evolutionary distance from one another. However, with ATCC strain 29212 and isolate V067230, only a few bands with the primer ERIC1R are visible, which could lead to a misinterpretation of the similarity.

With the primer ERIC1R, the *E. faecalis* isolates BK 8653 and BK 7183, BK 5187 and BK 165, BK 9190 and BK 3043 as well as V067230 and ATCC 29212 have no distance from each other in both UPGMA and NJ. The isolates BK 6037/2 and BK 9367 can be assigned to the isolates BK 8653 and BK 7183 with a relatively small distance using both methods. In UPGMA, the isolate BK 281 has a small distance to BK 9190 and BK 3043, whereas the same isolate is in another cluster when NJ is used. The isolates BK 5187 and BK 1653 have a small distance to the isolates BK 6747/2, BK 4997/3 and BK 1565 in both NJ and UPGMA. However, this group contains BK 848 additionally when UPGMA is applied, whereas in the case of NJ the isolate BK 848 is assigned to another cluster.

With the primer CC1, the *E. faecalis* isolates BK 6747/2, BK 6037/2 and BK 5187 as well as BK 4997/3, BK 5597/2 and BK 848 can be assigned to a group with small distances in both UPGMA and NJ. The same applies to the isolates BK 281, V067230 and ATCC 29212 as well as BK 8669, BK 8653 and BK 5363/2. Using both methods, BK 6886/2 and BK 9367 as well as BK 9190 and BK 3062 are characterized by their short distances.

For the *E. faecium* isolates, the RAPD-PCR was carried out with the primer M13R2 and the primer combination AP4 and ERIC1R. The analysis was carried out with the program PyElph 1.4 via UPGMA and NJ as with *E. faecalis*.

In the case of UPGMA, the *E. faecium* isolates Va 12610/5 and BK 6382 as well as BK 6024 and Va 14763 are in each group for all primers. For both M13R2 as well as AP4 and ERIC1R, BK 6300 and ST 2499 as well as Va 14727 and ST 2681 are only a small distance away from one another. For NJ, BK 6382 and Va 12610/5 are in a group. Moreover, Va 14763 and Va 12812 as well as Va 12812 and UR 6755 have a small distance.

With both UPGMA and NJ, a clonality of the *E. faecium* isolate Va 12610/5 and BK 6382 can be detected with all primers used. In the other isolates mentioned, however, the probability is high that these also have a certain clonality.

In both UPGMA and NJ, the two *E. faecium* isolates BK 6024 and Va 14727 have no distance to one another with the primer M13R2. In both methods, UR 6112, BK 6382 and Va12610 / 5 have a small distance from each other. In UPGMA, UR 6396 and BK 6300 form a group with ST 2499, whereas in NJ the isolate ST 2499 is far from the other two isolates. For UPGMA and NJ, the isolates Va 12812 and UR 6755 have a small distance from each other. The isolates ST 2400 and UR 6479 are assigned to this group in UPGMA, whereas isolate Va 14763 belongs to this group in the case of NJ. In the case of UPGMA, ST 2681 has a small distance to Va 14763, while the same isolate has a small distance to UR 6479 when NJ is applied. If a greater distance is observed between the isolates, the isolates ST 2681, Va 14763, BK 6024, Va 14727, ST 2400, UR 6479, Va 12812 and UR 6755 are in a larger cluster when UPGMA is used. A similar cluster is also present during the use of NJ, although there the isolates BK 6024 and Va 14727 are not included.

With the primer combination AP4 and ERIC1R the *E. faecium* isolates UR 6452, UR 6479, BK 6300, Va 12575/3, UR 6112 and ST 2499 were assigned to a group in both UPGMA and NJ. The isolates UR 6569 and ST 2400 have a small distance to each other in both UPGMA and NJ. No Distance was determined between the isolates Va 14854, Va 12610/5, UR 6369, BK 6382 and ST 2621 with NJ and UPGMA. However, UR 6755 and Va 14727 have no and ST 2681 a small distance in UPGMA to previously mentioned isolates, in NJ they are in a different cluster and have a small distance to Va 14079. Va 14079 can be assigned to BK 6024, Va 14763 and Va 12812 with a small distance by using both NJ and UPGMA.

Variable and conserved regions in the genome are differentially amplified by all primers used for a species and therefore lead to deviations in the dendrograms. Thereby, a certain clonality is probable in isolates which are similar only by applying one primer, even if this cannot be detected with both primers.

Literaturverzeichnis

- Abreu, A. C., Serra, S. C., Borges, A., Saavedra, M. J., Salgado, J. A., & Simões, M. (2014). Evaluation of the best method to assess antibiotic potentiation by phytochemicals against *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 79:125-134. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.002
- Aderem, A., Adkins, J. N., Ansong, C., Galagan, J., Kaiser, S., Korth, M. J., . . . Katze, M. G. (2011). A systems biology approach to infectious disease research: innovating the pathogen-host research paradigm. *mBio*. 2(1):1-4. doi:10.1128/mBio.00325-10
- Aktories, K., Förstermann, U., Hoffmann, F., & Starke, K. (2009). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Auflage. München. Urban & Fischer Verlag.
- Andersen, J. L., He, G., Kakarla, P., Ranjana, K. C., Kumar, S., Lakra, W. S., . . . Varela, M. F. (2015). Multidrug efflux pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, S. 1487-1547. doi:10.3390/ijerph120201487
- Backeljau, T., de Bruyn, L., de Wolf, H., Jordanes, K., van Dongen, S., & Winnepeinckx, B. (1996). Multiple UPGMA and Neighbour-joining trees and the performance of some computer packages. *Molecular Biology and Evolution*. 13(2):309-313.
- Banerjee, T. (2013). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of multidrug resistant *Enterococcus faecium* urinary isolates from a tertiary care centre, Northern India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 7(12): 2721-2723. doi:10.7860/JCDR/2013/6541.3742
- Barbier, N., Sauliner, P., & Chachaty, E. (1996). Random Amplified Polymorphic DNA typing versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(5):1096–1099. doi:0095-1137/96/\$04.0010
- Batzilla, C. F. (2006). *Untersuchungen zur Biofilmbildung und zum Quorum-sensing in Staphylococcus epidermidis*. Dissertation. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Bayer, U. (1985). *Pattern recognition problems in geology and paleontology*. München: Springer-Verlag.
- Becquet, P. (2003). EU assessment of *enterococci* as feed additives. *International Journal of Food Microbiology*. 88:247–254. doi:10.1016/S0168-1605(03)00187-9
- Brown, C. M. (2007). Fluorescence microscopy - avoiding the pitfalls. *Journal of Cell Sciences*. 120:1703-1705. doi: 10.1242/jsc.022079
- Chu, M., Zhang, M., Liu, Y., Kang, J., Chu, Z., Yin, K., . . . Wang, Y. (2016). Role of berberine in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Scientific Reports*. 6:1-9. doi:10.1038/srep24748
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2:114-122. doi:10.1038/nrd1008
- Deutsche Sepsis-Hilfe e.V. (2016). *Informationen zur Sepsis: Deutsche Sepsis-Hilfe e.V.* Abgerufen am 18. November 2016 von <http://www.sepsis-hilfe.org/de/informationen-zur-sepsis.html>

- Dömkes, S. (2008). *Epidemiologische und molekulargenetische Charakterisierung der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und dem neuen Des-F6-Chinolon BMS-284756 bei Staphylococcus aureus, Streptococcus spp., und Enterobacteriaceae*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Eichler, C. (2013). *Untersuchungen zur Biofilmbildung bei dem klinischen Isolat Enterococcus faecalis 1.10*. Dissertation. Universität Kassel.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2003). Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*. 9(8):1-7. doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (01. Januar 2016). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016*. Abgerufen am 27. Januar 2016 von <http://www.eucast.org>
- Franke, G. (2006). *Etablierung eines GFP-basierten Reportergensystems in Staphylokokken*. Dissertation. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
- Gatermann, S. (02. Mai 2011). *Staphylokokken*. Abgerufen am 14. April 2016 von <http://www.medmikro.ruhr-uni-bochum.de/Vorlesung/Staph/staph01.htm>
- Gene Ontology Consortium. (2016). *Ontology Documentation / Gene Ontology Consortium*. Abgerufen am 29. September 2016 von <http://geneontology.org/page/ontology-documentation>
- Gnis p dagogie. (2016). *Les marqueurs RAPD*. Abgerufen am 27. August 2016 von <http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-amelioration-marqueur-rapd.html>
- Gronau, I., & Moran, S. (2007). Optimal implementations of UPGMA and other common clustering algorithms. *Information Processing Letters*. 104:205–210. doi:10.1016/j.ipl.2007.07.002
- Habib, G., Lancellotti, P., Antunes, M. J., Bongiori, M. G., Casalta, J., Del Zotti, F., . . . Snygg-Martin, U. (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis. *European Heart Journal*. 36(44):3075-3128. doi:10.1093/eurheartj/ehv319
- Hacker, J., & Kumm, S. (2015). Antibiotika und Antibiotikaresistenzen - Vorkommen und Perspektiven. *Deutsches  rzteblatt*. 112(23):1046-1049.
- Hendricks, O., Butterworth, T. S., & Kristiansen, J. E. (2003). The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22:262-264. doi:10.1016/S0924-8579(03)00205-X
- Hendricks, O., Molnar, A., Butterworth, T. S., Butaye, P., & Kolmos, H. J. (2005). In vitro activity of phenothiazine derivatives in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 96:33–36.
- Hillis, D. M., Huelsenbeck, J. P., & Cunningham, C. W. (2010). Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science*. 264:671-677.
- Hof, H., & Dörries, R. (2014). *Medizinische Mikrobiologie*. 5. Auflage. Stuttgart. Georg Thieme Verlag.
- H iby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35:322–332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011

- Hubener, J., & Goldmann, D. A. (1999). Coagulase-negative *staphylococci*: role as pathogens. *Annual Review of Medicine* 50:223-236.
- Idil, N., & Bilkay, I. S. (2014). Application of RAPD-PCR for determining the clonality of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different hospitals. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57(4):548-553. doi:10.1590/S1516-8913201402116
- Institut für Mikroökologie. (2016). *Biofilm durch Atopobium vaginae*. Abgerufen am 13. Oktober 2016 von <http://www.mikrooek.de/fuer-aerzte-und-therapeuten/unsere-diagnostik/gynaekologie/vaginalflora-bestimmen/biofilm-durch-atopobium-vaginae/>
- Kaatz, G. W., Moudgal, V. V., Seo, S. M., & Kristiansen, J. E. (2003). Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(2):719–726. doi:10.1128/AAC.47.2.719–726.2003
- Karow, T., & Lang-Roth, R. (2015). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 24. Auflage. Pulheim. Thomas Karow Verlag.
- Khakabimamaghani, S., Najafi, A., Ranjbar, R., & Raam, M. (2013). GelClust: a software tool for gel electrophoresis images analysis and dendrogram generation. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 111(2):512–518. doi:10.1016/j.cmpb.2013.04.013
- Kipp, F., Friedrich, A. W., Becker, K., & von Eiff, C. (2004). Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylokokkus-aureus*-Stämme. *Deutsches Ärzteblatt*. 101:2044–2045.
- Köhler, W., Eggers, H. J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H., & Pulverer, G. (2001). *Medizinische Mikrobiologie*. München. Urban und Fischer.
- Kourtesi, C., Ball, A. R., Huang, Y.-Y., Jachak, S. M., Vera, D. M., Khondkar, P., . . . Tegos, G. P. (2013). Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. *The Open Microbiology Journal*. 7:34-52.
- Kristiansen, M. M., Leandro, C., Ordway, D., & Martins, M. (2003). Phenothiazines alter resistance of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) to oxacillin in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22:250-253. doi:10.1016/S0924-8579(03)00200-0
- Kumar, N. S., & Gurusubramanian, G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision*. 11(3):116-124.
- Maciá, M. D., Rojo-Molinero, E., & Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 20:981-990.
- Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*. 87:1137–1147. doi:10.1016/j.biochi.2005.04.012
- Martin, B., Corominas, L., Garriga, M., & Aymerich, T. (2009). Identification and tracing of *Enterococcus spp.* by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. *Journal of Applied Microbiology*. 106:66-77. doi:doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03976.x
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., & Aymerich, T. (2005). Genetic diversity and safety aspects of *enterococci* from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 98:1177–1190. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02555.x

- Martins, M., Bleiss, W., Marko, A., Ordway, D., Viveiros, M., Leandro, C., . . . Amaral, L. (2004). Clinical concentrations of thioridazine enhance the killing of intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an *In Vivo*, *Ex Vivo* and Electron Microscopy Study. *in vivo*. 18:787-794. doi:0258-851X/2004 \$2.00+.40
- Müller, D. (2003). *Transkriptom- und Proteomanalytische Charakterisierung der Small-Colony-Variante von Staphylococcus aureus*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Nagel, M. (2011). *Die Rolle von mobilen genetischen Elementen auf die Evolution von Antibiotikaresistenzen bei Staphylococcus aureus*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Neumayer, D. S. (2014). *Klinische Staphylokokkenstämme mit einem verminderten Acetatkatabolismus: Metabolische Grundlagen und Auswirkungen auf die Persistenz*. Dissertation. Universität des Saarlandes.
- Oethinger, M. (2000). *Kurzlehrbuch Mikrobiologie und Immunologie*. 10. Auflage. München. Urban & Fischer Verlag.
- Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*. 13(9). doi:10.1186/1471-2105-13-9
- Pereira, M. S., Leal, N. C., Leal, T. C., Sobreira, M., & de Almeida, A. M. (2002). Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 35:32-36.
- Piddock, L. J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 19 (2):382-402. doi:10.1128/CMR.19.2.382-402.2006
- Polyzou, A., Slavakis, A., Pournaras, S., Maniatis, A. N., Sofianou, D., & Tsakris, A. (2001). Predominance of a methicillin-resistant clone susceptible to erythromycin and several other non-betalactam antibiotics in a Greek hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48:231-234.
- Rahbar, M., Mehrgan, H., & Hadji-nejad, S. (2010). Enhancement of vancomycin activity by phenothiazines against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *in vitro*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 107:676-679. doi:10.1111/j.1742-7843.2010.00558.x
- Ran, S., Liu, B., Jiang, W., Sun, Z., & Liang, L. (2015). Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. *Frontiers in Microbiology*. 6:1-11. doi:10.3389/fmicb.2015.00795
- Robert Koch Institut. (2010). Enterokokken mit Vancomycin-Resistenz in deutschen Krankenhäusern 2008/2009. *Epidemiologisches Bulletin*. 44:427-436.
- Saeglitz, C. (2004). *Untersuchungen der genetischen Diversität von Maiszünsler-Populationen (Ostrinia nubilalis, Hbn.) und ihrer Suszeptibilität gegenüber dem Bacillus thuringiensis (Bt)-Toxin als Grundlage für ein Resistenzmanagement in Bt-Maiskulturen*. Dissertation. Rheinisch-Westfälische Technischen Hochschule Aachen.
- Saier, M. H., & Paulsen, I. (2001). Phylogeny of multidrug transporters. *Cell & Developmental Biology*. 12:205-213. doi:10.1006/scdb.2000.0246
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4):406-425.

- Sanyal, P. S. (2015). *Die Wirkung membranaktiver Peptide auf Biofilminduzierung und Biofilmeliminierung*. Dissertation. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). doi:10.5445/IR/1000048878
- Sella, N. (2016). *Resistenzermittlungen bei Enterococcus faecalis*. Forschungs- und Entwicklungsmodul. Hochschule Mittweida.
- Sello, J. (28. November 2011). *New compound defeats drug-resistant bacteria*. (B. University, Hrsg.) Abgerufen am 13. Dezember 2016 von <https://news.brown.edu/articles/2011/11/bacteria>
- Spitaler, M. (2008). *Imperial College London*. Von <http://www.imperial.ac.uk/media/imperial-college/medicine/facilities/film/film-gip.pdf> abgerufen
- Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G. D., Kaufmann, S. H., & Schulz, T. (2012). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 7. Auflage. Heidelberg. Springer-Verlag GmbH.
- Thanacoody, H. K. (2007). Thioridazine: resurrection as an antimicrobial agent? *British Journal of Clinical Pharmacology*. 64(5):566–574. doi:10.1111/j.1365-2125.2007.03021.x
- ThermoFisher. (15. Juli 2004). *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits*. Abgerufen am 04. Januar 2017 von <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07007.pdf>
- Van Bambeke, F., Balzi, E., & Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*. 60:457–470.
- Vu, J., & Carvalho, J. (2011). Enterococcus: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Frontiers in Biology*. 6(5):357-266. doi:10.1007/s11515-011-1167-x
- Vuong, C., & Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*. 4:481–489.
- Webber, M. A., & Piddock, L. J. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51:9-11. doi:10.1093/jac/dkg050
- Weiß, M. (2003). *Wirkung von Enterococcus faecium auf den Organismus neonataler Hundewelpen*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- WHO. (2005). Thioridazine withdrawn due to poor benefit/risk profile. *WHO Pharmaceuticals Newsletter*. 1:1-2. Von <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s8116e/s8116e.pdf> abgerufen
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*. 22:474-481.
- www.bacteriainphotos.com. (2016). *Enterococcus faecalis under microscope*. Abgerufen am 15. Mai 2016 von <http://www.bacteriainphotos.com/bacteria%20under%20microscope/enterococcus%20faecalis%20microscopy.html#>
- Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kränzler, H., Batzilla, C., & Kozitskaya, S. (2006). Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 28S:S14-S20. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.05.012

Anhang**Tabelle 13: Reinheit der Antibiotika, Lösemittel und Ansatz der Stammlösung**

Antibiotikum	Reinheit	Lösemittel	Ansatz Stammlsg. 10 mg/ml
Cefazolin Sodium Salt	95,4 %	destilliertes Wasser	10,48 mg/ml
Ciprofloxacin Hydrochloride	90,1 %	destilliertes Wasser	11,10 mg/ml
Clindamycin Hydrochloride Monohydrate	92,1 %	destilliertes Wasser	10,86 mg/ml
Flucloxacillin Sodium	95,4 %	destilliertes Wasser	10,48 mg/ml
Rifampicin	100 %	Methanol	10 mg/ml
Vancomycin Hydrochloride	100 % *	destilliertes Wasser	10 mg/ml

Stammlsg. = Stocklösung

* Vancomycin ist ein sehr großes Molekül, daher ist das Hydrochlorid zu vernachlässigen

Tabelle 14: Reinheit der EPI's, Lösemittel und Ansatz der Stammlösung

Antibiotikum	Reinheit	Lösemittel	Ansatz Stammlsg. 10 mg/ml
Probenecid	100 %	DMSO	10 mg/ml
Reserpin	100 %	Essigsäure, unverdünnt	Stammlsg. betrug hier 5 mg/ml aufgrund der Löslichkeit
Sertralin Hydrochloride	89,6 %	DMSO	11,19 mg/ml
Thioridazin Hydrochloride	75,6 %	destilliertes Wasser	13,23 mg/ml

Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medium	Zusammensetzung
Mueller-Hinton-Bouillon	<ul style="list-style-type: none"> - Rinder-Infus 2,0 g/l - Pepton aus Casein (saures Hydrosat) 17,5 g/l - Maisstärke 1,5 g/l - pH-Wert $7,4 \pm 0,2$
Todd-Hewitt-Bouillon	<ul style="list-style-type: none"> - Herz-Infus 3,1 g/l - Pepton 20 g/l - Glucose 2g/l - Natriumcarbonat 2,5 g/l - Natriumchlorid 2 g/l - Dinatriumphosphat 0,4 g/l - pH-Wert $7,8 \pm 0,2$

MHK-BestimmungTabelle 16: MHK-Werte der EPI's für *E. faecalis* in mg/l

Stamm	Probenecid	Reserpin	Sertralin	Thioridazin
<i>E. faecalis</i> , BK 245	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 281	> 512	8	32	32
<i>E. faecalis</i> , BK 848	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 905	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 1565	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 1653	> 512	16	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 2164	> 512	8	32	16
<i>E. faecalis</i> , BK 3043	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 3062	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 4997	> 512	8	16	32
<i>E. faecalis</i> , BK 5167	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 5363	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 5597	> 512	16	16	32
<i>E. faecalis</i> , BK 6037	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 6747	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 6886	> 512	8	32	32
<i>E. faecalis</i> , BK 7183	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 8653	> 512	16	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 8669	> 512	8	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 9190	> 512	16	16	16
<i>E. faecalis</i> , BK 9367	> 512	16	16	16

Tabelle 17: MHK-Werte der EPI's für *E. faecium* in mg/l

Stamm	Probenecid	Reserpin	Sertralin	Thioridazin
<i>E. faecium</i> , BK 6024	> 512	8	16	16
<i>E. faecium</i> , BK 6300	> 512	8	8	16
<i>E. faecium</i> , BK 6382	> 512	16	8	16
<i>E. faecium</i> , ST 2400	> 512	8	8	16
<i>E. faecium</i> , ST 2499	> 512	8	16	16
<i>E. faecium</i> , ST 2621	> 512	16	16	16
<i>E. faecium</i> , ST 2681	> 512	8	8	16
<i>E. faecium</i> , UR 6112	> 512	16	16	16
<i>E. faecium</i> , UR 6396	> 512	16	8	16
<i>E. faecium</i> , UR 6452	> 512	16	8	16
<i>E. faecium</i> , UR 6479	> 512	16	16	16
<i>E. faecium</i> , UR 6560	> 512	16	16	16
<i>E. faecium</i> , UR 6755	> 512	8	16	16
<i>E. faecium</i> , Va 12610/5	> 512	16	16	16
<i>E. faecium</i> , Va 12757/3	> 512	16	16	16
<i>E. faecium</i> , Va 12812	> 512	8	16	32
<i>E. faecium</i> , Va 14079	> 512	8	8	16
<i>E. faecium</i> , Va 14272	> 512	16	16	16
<i>E. faecium</i> , Va 14762	> 512	16	8	16
<i>E. faecium</i> , Va 14854	> 512	16	16	16

Tabelle 18: MHK-Werte der EPI's für *S. aureus* in mg/l

Stamm	Probenecid	Reserpin	Sertralin	Thioridazin
<i>S. aureus</i> , ATCC 29213	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , BK 12963	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 17446	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 17834	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 17857	> 512	8	16	32
<i>S. aureus</i> , Va 17957	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 17999	> 512	8	16	32
<i>S. aureus</i> , Va 18585	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 18702	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 19149	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 31203	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 31397	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 31467	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 31505	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 31533	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 31544	> 512	8	16	32
<i>S. aureus</i> , Va 31546	> 512	8	16	8
<i>S. aureus</i> , Va 31650	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 31669	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 31685	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 31727	> 512	8	16	16
<i>S. aureus</i> , Va 32261	> 512	8	8	16

DNA-Isolation**Tabelle 19: DNA-Konzentrationen von *E. faecalis* in ng/µl**

Bezeichnung	DNA-Konz.	Ratio	A260	A280
BK 1565	25	1,93	0,5	0,259
BK 1653	34	1,97	0,68	0,344
BK 095	25,1	2,07	0,502	0,243
BK 848	11,7	1,97	0,235	0,119
BK 5597/2	8,5	1,94	0,169	0,087
BK 4997/3	15,8	1,86	0,316	0,17
BK 6037/2	15,8	1,99	0,315	0,158
BK 5187	69,8	2,03	1,395	0,688
BK 6747/2	11,2	1,83	0,223	0,122
BK 7183	17,4	2,05	0,347	0,17
BK 5363/2	10,6	2	0,213	0,106
BK 8653	10,8	2,15	0,217	0,101
BK 8669	5,6	1,81	0,0056	0,0031
BK 9367	32,2	2,12	0,0322	0,0152
BK 6886/2	38,2	1,98	0,0382	0,0193
BK 281	25,9	2,19	0,0259	0,0118
BK 2164	16	1,95	0,016	0,0082
BK 3043	41,4	2,16	0,0414	0,0192
BK 3062	12,2	2,1	0,0122	0,0058
BK 9190	15,3	1,99	0,0153	0,0077
ATCC 29212	57,6	2,12	0,0576	0,0272
V067230	39,5	2,21	0,0395	0,0179
BK 245	51,2	2,06	0,0512	0,0249

Tabelle 20: DNA-Konzentration von *E. faecium* in ng/μl

Bezeichnung	DNA-Konz.	Ratio	A260	A280
UR 6479	19,1	1,99	0,0191	0,0096
UR 6452	30,4	2,01	0,0304	0,0151
UR 6112	18,5	2,06	0,0185	0,009
ST 2400	22,8	2,04	0,0228	0,0112
UR 6560	13,2	2	0,0132	0,0066
Va 12757/3	27,2	2,05	0,0272	0,0133
Va 12610/5	47,3	2	0,0473	0,0237
Va 14727	25,1	2,11	0,0251	0,0119
Va 14763	93,1	2,04	0,0931	0,0457
Va 14854	18,1	1,83	0,0181	0,0099
UR 6755	54,3	1,94	0,0543	0,028
ST 2621	19,9	2,05	0,0199	0,0097
Va 14079	32	2,12	0,032	0,0151
BK 6382	23,1	1,94	0,0231	0,0119
Va 12812	641,5	2,11	0,6415	0,3046
ST 2499	91,6	1,94	0,0916	0,0472
BK 6024	35,1	1,99	0,0351	0,0176
BK 6300	33,4	1,96	0,0334	0,017
UR 6396	49,9	2,03	0,0499	0,0246
ST 2681	59,3	2,02	0,0593	0,0293

Tabelle 21: DNA-Konzentrationen von *S. aureus* in ng/μl

Bezeichnung	DNA-Konz.	Ratio	A260	A280
Va 17957	109,2	1,61	0,1092	0,0679
Va 17999	592,4	1,59	0,5924	0,3727
Va 17834	38,8	1,65	0,0388	0,0235
Va 18585	344,6	1,64	0,3446	0,2102
Va 19149	79,7	1,59	0,0797	0,05
Va 17857	365,7	1,65	0,3657	0,2218
Va 18702	116,2	1,67	0,1162	0,0694
Va 17446	121,2	1,62	0,1212	0,0748
Va 31685	108,2	1,72	0,1082	0,0628
Va 31727	328,1	1,61	0,3281	0,2033
Va 31669	588,4	1,61	0,5884	0,3649
Va 31546	169,5	1,61	0,1695	0,1055
Va 32261	37	1,58	0,037	0,0234
Va 31533	164,5	1,61	0,1645	0,1021
Va 31505	106,3	1,63	0,1063	0,0654
Va 31544	446,3	1,65	0,4463	0,2705
Va 31203	5,6	2,07	0,0056	0,0027
Va 31650	23,9	1,67	0,0239	0,0143
Va 31467	204,7	1,61	0,2047	0,1271
ATCC 29213	143,5	1,62	0,1435	0,0886
BK 12963	271,5	1,61	0,2715	0,1691
Va 31397	638,5	1,65	0,6385	0,386

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 12.01.2017

Nadine Sella